

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero
Arachis associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

DOUTORANDA: ADRIANA REGINA CUSTODIO – BIÓLOGA
ORIENTADOR: Dr. JOSÉ FRANCISCO MONTENEGRO VALLS

FLORIANÓPOLIS, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero
Arachis associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

DOUTORANDA: ADRIANA REGINA CUSTODIO – BIÓLOGA
ORIENTADOR: Dr. JOSÉ FRANCISCO MONTENEGRO VALLS

FLORIANÓPOLIS, 2009

SUMÁRIO

Sumário	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	x
Pensamento	xii
Dedicatória	xiii
Agradecimentos	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xviii
1- Justificativa	1
2- Objetivos	3
2.1- Objetivo geral	3
2.2- Objetivos específicos	3
3- Revisão bibliográfica	4
3.1- O melhoramento genético do amendoim no Brasil	4
3.2- O gênero <i>Arachis</i>	10
3.3- Caracterização citogenética	12
3.4- A origem dos genomas A e B do amendoim	16
3.5- Hibridação em <i>Arachis</i>	17
3.6- Morfologia da flor em <i>Arachis</i>	19
3.7- Descrição das espécies alvo do estudo de cruzabilidade	23
3.7.1- <i>Arachis gregoryi</i> C. E. Simpson, Krapov. & Valls	23
3.7.2- <i>Arachis magna</i> Krapov., W. C. Gregory & C. E. Simpson	24
3.7.3- <i>Arachis ipaënsis</i> Krapov. & W. C. Gregory	25
3.7.4- <i>Arachis williamsii</i> Krapov. & W. C. Gregory	26
3.7.5- <i>Arachis krapovickasii</i> C. E. Simpson, Krapov. & Valls	27
4- Material	29
5- Métodos	34
5.1- Condução dos experimentos	34

5.2- Germinação dos acessos	34
5.3- Delineamento dos cruzamentos	35
5.3.1- Técnica de cruzamentos	37
5.4- Análise da viabilidade do grão-de-pólen por coloração e germinação	38
5.5- Resgate de embriões dos híbridos	39
5.6- Análise molecular	40
5.7- Análise citogenética	45
5.7.1- Análise mitótica	45
5.7.2- Análise de acessos com hibridização <i>in situ</i> por fluorescência – FISH	45
6- Resultados e discussão	49
6.1- Análise da viabilidade do grão-de-pólen por coloração e germinação	49
6.2- Hibridação	52
6.3- Análise molecular	92
6.4- Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência – FISH	102
7- Conclusões	109
8- Bibliografia	111
9- Anexos	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Série histórica de produção de amendoim no Brasil em mil toneladas por ano.	9
Figura 2 – Morfologia do cromossomo “SAT”. Adaptado de Fernández & Krapovickas (1994), página 196.	14
Figura 3: Elongação do hipâncio e desenvolvimento do botão floral no amendoim. Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 8.	19
Figura 4: Flor de amendoim dissecada mostrando: (a) hipâncio, (b) sépalas, (c) estandarte, (d) asas, (e) quilha, (f) estames, (g) estigma e estilete. Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 7.	20
Figura 5: Três grupos de estames: (a) dois estaminódios estéreis, (b) quatro estames globosos com anteras dorsifixas e (c) quatro estames com anteras adnatas oblongas Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 7.	21
Figura 6: Porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen de acessos silvestres de <i>Arachis</i> pelo método indireto de coloração analisados durante o ano 2006/2007 (a) e 2007/2008 (b).	49
Figura 7: Porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen de acessos silvestres de <i>Arachis</i> pelo método direto de germinação analisados durante o ano 2006/2007 (a) e 2007/2008 (b).	50
Figura 8: A) Floreiras com a genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 no início da estação de hibridação. B) Floreiras com a genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 dois meses após o início da estação de hibridação.	53
Figura 9: A) Floreiras com os genitores masculinos no início da estação de hibridação. B) Floreiras com os genitores masculinos dois meses após o início da estação de	54

hibridação.

Figura 10: Flor da genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 emasculada e polinizada artificialmente.	55
Figura 11: Número de polinizações realizadas entre os acessos durante o primeiro ano de cruzamentos nos anos 2006/2007.	56
Figura 12: Número de polinizações realizadas entre os acessos durante o segundo ano de cruzamentos 2007/2008.*Cruzamento duplicado.	56
Figura 13: Flores da genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 polinizadas artificialmente, etiquetadas e marcadas com um cordão.	57
Figura 14: Surgimento do “peg” na base da flor da genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 que foi polinizada artificialmente.	58
Figura 15: Marcação diferencial do “peg” da genitora <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 polinizada artificialmente.	58
Figura 16: Híbridos de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis williamsii</i> Wi 1118 com ramos laterais superiores a 2,5m.	62
Figura 17: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis hoehnei</i> V 13985.	63
Figura 18: A) Germinação espontânea do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis microsperma</i> V 14042. B) Plântula do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis microsperma</i> V 14042.	64
Figura 19: A) Germinação espontânea do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis stenosperma</i> V 10309. B) Plântula do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis stenosperma</i> V 10309.	64
Figura 20: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis schininii</i> V 9923.	65
Figura 21: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis kempff-mercadoi</i> V 13250.	66

Figura 22: Característica do marcador morfológico paterno pilosidade na face adaxial do folíolo do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis villosa</i> V 14309.	67
Figura 23: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis diogoi</i> Vp 5000.	68
Figura 24: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis magna</i> K 30097.	70
Figura 25: A) Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis valida</i> V 13514. B) Segmento de fruto formado pelo híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis valida</i> V 13514.	71
Figura 26: A) Cromossomos do híbrido triplóide de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis hypogaea</i> cultivar Tatu. B) Plântula do híbrido triplóide de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis hypogaea</i> cultivar Tatu.	72
Figura 27: Característica do marcador morfológico paterno glândulas na face abaxial do folíolo do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis glandulifera</i> V 13738.	73
Figura 28: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis batizocoi</i> K 9484 em que não houve o desenvolvimento da parte aérea.	75
Figura 29: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis batizocoi</i> K 9484 que se desenvolveu sob condições de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças.	76
Figura 30: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis batizocoi</i> K 9484 mantidos <i>in vitro</i> na Embrapa Hortaliças.	77
Figura 31: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis hoehnei</i> K 30006 que se desenvolveu sob condições de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças.	78
Figura 32: A) Plântula do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis krapovickasii</i> Wi 1291. B) Planta adulta do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis krapovickasii</i> Wi	79

1291 em florescimento.

Figura 33: Plântula do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis cruziana</i> Wi 1302-2.	80
Figura 34: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis ipaënsis</i> K 30076.	80
Figura 35: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis benensis</i> K 30005.	82
Figura 36: Híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis helodes</i> V 6325.	83
Figura 37: Geração F ₂ do híbrido de <i>Arachis gregoryi</i> V 14957 x <i>Arachis gregoryi</i> V 14753.	84
Figura 38: Dendograma baseado em diversidade alélica, mostrando o agrupamento de 96 acessos de <i>Arachis</i> .	101
Figura 39: Acessos de <i>Arachis</i> analisados por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH). Em verde sítios 5S; em vermelho sítios 45S.	104
Figura 40: Acessos de <i>Arachis</i> analisados por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH). Em verde, sítios 5S; em vermelho, sítios 45S.	105
Figura 41 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de <i>Arachis decora</i> , <i>Arachis diogoi</i> , <i>Arachis glandulifera</i> e <i>Arachis palustris</i> no território brasileiro.	128
Figura 42 – Mapa de distribuição geográfica das coletas do acesso de <i>Arachis villosa</i> no território brasileiro.	129
Figura 43 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de <i>Arachis hoehnei</i> , <i>Arachis magna</i> e <i>Arachis stenosperma</i> no território brasileiro.	130
Figura 44 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de <i>Arachis gregoryi</i> , <i>Arachis helodes</i> , e <i>Arachis vallsii</i> no território brasileiro.	131
Figura 45 – Mapas de distribuição geográfica das coletas dos acessos	132

de *Arachis kuhlmannii* e *Arachis valida* no território brasileiro.

- Figura 46 - Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis linearifolia*, *Arachis microsperma*, e *Arachis praecox* e *Arachis simpsonii* no território brasileiro. 133
- Figura 47 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis archeri*, *Arachis cryptopotamica*, e *Arachis douradiana* e *Arachis stenophylla* no território brasileiro. 134
- Figura 48 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis brevipetiolata*, *Arachis hermannii*, e *Arachis paraguariensis* no território brasileiro. 135
- Figura 49 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis appressipila*, *Arachis lignosa*, e *Arachis matiensis* no território brasileiro. 136
- Figura 50 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis kretschmeri*, *Arachis pflugeae*, e *Arachis subcoriacea* no território brasileiro. 137

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-. Cultivares de amendoim, <i>Arachis hypogaea</i> , registradas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura no período de 01/01/1998 a 19/09/2006.	7
Tabela 2- Lista das espécies, com seus respectivos números de BRA, a sigla dos coletores, os acessos, a origem, o município e as coordenadas geográficas em graus, minutos e metros de cada um dos materiais utilizados no desenvolvimento da tese.	30
Tabela 3- Ciclos de cruzamentos realizados entre os anos de 2006/2007 e 2007/2008. Lista dos acessos, espécies e o genoma dos genitores envolvidos nos dois ciclos de hibridação.	36
Tabela 4- Quantidade dos reagentes utilizados para a realização das PCRs	42
Tabela 5- Temperaturas utilizadas durante a amplificação das reações de PCR.	42
Tabela 6- Sistemas multiplex, primers marcados e suas respectivas fluorescências, tamanho em pares de base, temperatura de amplificação e os produtos que foram amplificados e analisados.	44
Tabela 7- Resultados dos cruzamentos intra e interespecíficos realizados entre espécies do gênero <i>Arachis</i> . Genitores masculinos e seu respectivo ano de cruzamento, genoma do genitor masculino, acessos dos genitores envolvidos, número total de polinizações realizadas (NPO), número de segmentos de frutos obtidos (NSF), número de híbridos confirmados (NH), porcentagem de sucesso por cruzamento, porcentagem de viabilidade do pólen dos	60

híbridos (VPH).

Tabela 8-	Genitores e acessos envolvidos nos cruzamentos, porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen dos genitores por coloração (VPPC) e germinação (VPPG), porcentagem viabilidade do grão-de-pólen dos híbridos por coloração (VPH), número de segmentos de frutos produzidos por cruzamento (NSF), número de híbridos confirmados (NH), desenvolvimento das plântulas híbridas: falta de sincronia de florescimento entre os genitores (FSG), baixa qualidade das flores dos genitores (BQG), aborto do embrião (AE), morte nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas (MEI), material cultivado <i>in vitro</i> (IV), plântulas com bom desenvolvimento (PBD) e encaminhamento dos híbridos ao pré-melhoramento (EPM).	91
Tabela 9-	Número de indivíduos analisados (N), número de alelos (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 30 locos microssatélites analisados em 96 acessos de <i>Arachis</i> spp.	93
Tabela 10:	Acessos da secção <i>Arachis</i> analisados por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH), número de sítios 45S e 5S, número de cromossomos sintênicos (45S/5S), número de cromossomos com bandas DAPI. Para fins de comparação, acrescentam-se dados da literatura referentes às espécies com o nome entre colchetes.	102

“Ali, no lugar, ele fizera um roçado, defendera-o com o tapume de varas. Amendoim – era o que aquele ano tinha plantado. O chão ali era bom e a terra clara – ah, como carecia de ser, ele em seu papagueio explicava. Porque o amendoim quando produz, abaixa os ramos, para enterrar uma por uma as frutas, escondendo-as, elas tomavam na casca a cor da terra.”

**João Guimarães Rosa
Noites do Sertão - Buriti**

Dedico

**Aos meus pais,
Joaquim e Iolete,
pela eterna confiança.**

**A Luís Fernando,
amigo, companheiro e amor.**

Ao bebê que está a caminho.

AGRADECIMENTOS

Para a Universidade Federal de Santa Catarina através do Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelos conhecimentos proporcionados durante o curso.

Ao Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* e à Fundação Bill e Melinda Gates pelo apoio financeiro.

A querida Bernadete M. P. Ribas, a “Berna”, sempre pronta para resolver todos os meus problemas burocráticos junto ao curso.

Ao Dr José F. M. Valls, pela orientação, confiança e estímulo no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr Charles E. Simpson, pelo convite de estágio na Texas A&M University e pelas sugestões nos cruzamentos.

Ao Dr Guillermo J. Seijo, pelo convite de estágio no Laboratório de Citogenética y Evolución Vegetal del Instituto de Botánica del Nordeste –IBONE- Corrientes Argentina.

Ao Dr Antonio Krapovickas, pelos livros e as instigantes histórias sobre o amendoim.

A Dr^a Hebe Y. Rey e família, pela amizade e carinho que sempre me receberam em sua casa.

A Dr^a Graciela I. Lavia e família, pelas conversas sempre muito agradáveis e pelos momentos compartilhados junto aos seus familiares.

Aos amigos Luis Henrique Robledo e Pedro Juan Caballero e suas famílias, pela atenção e carinho que sempre dedicaram a mim.

Ao Dr Márcio C. Moretzsohn, pelo apoio nas atividades de caracterização molecular.

Ao Dr Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho, por ceder espaço em seu telado para acomodar parte dos experimentos desta tese.

Ao Dr. Antonio C. Torres e José Getúlio da Silva Filho, pelo apoio e manutenção *in vitro* dos híbridos na Embrapa Hortaliças.

A Dr^a Alessandra P. Fávero, pela agradável amizade e apoio no desenvolvimento da tese.

A Dr^a Marisa T. Pozzobon, pela amizade, conselhos e relaxamento durante as pinturas.

Aos demais pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Universidade Católica de Brasília que acompanharam o desenvolvimento do trabalho: Andréa P. S. Peñaloza, Ana Claudia G. Araújo, Fábio O. Freitas, Marcos A. Gimenes, Patrícia M. Guimarães, Soraya L Bertioli e David Bertioli.

Ao Nilton C. dos Santos, Tita, por todo suporte, ajuda na dura rotina das atividades de telado e pelo animado bate-papo.

A Sileuza dos Santos, sempre prestativa em ajudar com os materiais de citogenética.

As amigas, Maguida F. da Silva, Juliana Vieira, Valéria R. Ramos e Viviane Talamini pela feliz companhia, aos agradáveis momentos de descontração, apoio no trabalho, forças para continuar e, acima de tudo, pela amizade, muito obrigada, vocês são incríveis.

Aos amigos do café Andréa, César, Marco, Regis, Túlio, Carol, Dany, Eva, Juliana, Karen, Marília, Thaisa, Flávia, Rodrigo e Ediene obrigada pela companhia.

Aos estagiários César e João, pelo auxílio junto às atividades de telado.

A todos os colegas do RGV.

A todos os meus familiares que apoiaram esta jornada.

RESUMO

Foram realizadas 1368 polinizações envolvendo 39 combinações híbridas. A espécie genitora foi *Arachis gregoryi*, acesso V 14957, que foi cruzada com diferentes espécies do genoma A, B, D, com espécies com $2n=2x=18$, $2n=2x=40$ e com a Secção *Erectoides*. Para todos os genitores e para os híbridos que produziram flores foi estimada a porcentagem de viabilidade do pólen. O conjunto de dados obtidos permite inferir que existe cruzabilidade entre *A. gregoryi* e várias espécies da secção *Arachis* associadas, em maior ou menor grau ao genoma B de *A. hypogaea*. Isto mostra o potencial para a inclusão em trabalhos de pré-melhoramento destinados à formação de linhagens a incorporar ao melhoramento genético do amendoim. Houve a formação de híbridos com espécies associadas ao genoma A de *A. hypogaea*, o que permite a produção de anfidiplóides sintéticos. Com *A. hypogaea* houve a formação de híbridos triplóides e, assim como com *A. monticola*, em alguns casos ocorreu aborto do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento. Devido do pouco desenvolvimento das plantas ainda não foi possível confirmar a hibridação com a espécie de $2n=2x=18$.

Foi estimada a diversidade alélica por marcadores moleculares microsatélites, com o objetivo de conhecer as relações de afinidade de 96 acessos pertencentes a 35 diferentes espécies. Houve a formação de nove grupos principais, ficando evidente a coesão dos acessos de *A. gregoryi*, e sua estreita associação com *A. ipaënsis* e *A. valida*, e, em menor grau, com *A. magna*, cujos acessos mostraram-se heterogêneos. O conjunto de espécies diplóides com $2n=20$ e sem o par de cromossomos A, *A. williamsii*, *A. batizocoi*, *A. krapovickasii*, *A. glandulifera*, *A. cruziana*, *A. benensis* e *A. vallsii* situaram-se mais distantes do conjunto de acessos de *A. gregoryi*.

Na hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foram analisados 12 acessos brasileiros de cinco espécies. Os acessos de *A. gregoryi* mostraram maior similaridade do que a espécie simpátrica *A. magna* que se mostrou mais

heterogênea e, também a sua proximidade com *A. ipaënsis*, *A. valida* e *A. williamsii*.

ABSTRACT

Pollinations were performed in 1368 involving 39 hybrid combinations. The mother plant was *Arachis gregoryi*, accession V 14957, which was crossed with genome A, B, D, species with $2n=2x=18$, $2n=2x=40$ and *Section Erectoides*. For all parents and the hybrids that produced flowers was estimated that the percentage of pollen viability. The set of data we infer that there crossability between *A. gregoryi* and several species of *Section Arachis* linked to a greater or lesser extent to the B genome of *A. hypogaea*. This shows the potential for inclusion in the pre-breeding for the formation of lines to incorporate the genetic improvement of peanut. There were formed hybrids with related species to the A genome of *A. hypogaea*, which allows the production of synthetic amphiploids. With *A. hypogaea* was the formation of triploids hybrids and, as well as, *A. monticola*, in some cases of abortion occurred in the early stages of embryo development. Because of the low development of the plants has not been possible to confirm the hybridization with aneuploidy. Allelic diversity was estimated by microsatellite molecular markers, aiming to understand the relationships of affinity of 96 accessions belonging to 35 different species. There was a formation of nine major groups, with clear access to the cohesion of *A. gregoryi*, and his close association with *A. ipaënsis* and *A. valida*, and to a lesser extent, with *A. magna*, which proved to be heterogeneous. The set of diploid species with $2n=20$ and without the pair of chromosomes A, *A. williamsii*, *A. batizocoi*, *A. krapovickasii*, *A. glandulifera*, *A. cruziana*, *A. benensis* and *A. vallsii* found to be the most distant from all the accessions of *A. gregoryi*. In fluorescence in situ hybridization (FISH) were analyzed 12 accessions of five Brazilian species. The accessions of *A. gregoryi* showed greater similarity than the sympatric species *A. magna* which was more heterogeneous and also its proximity to *A. ipaënsis*, *A. valida* and *A. williamsii*.

1- JUSTIFICATIVA

O Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis*, doravante denominado BAG-*Arachis*, da Embrapa/Cenargen vem conservando e ampliando a variabilidade disponível, a quase 30 anos, do germoplasma silvestre de amendoim. O uso dessa fonte de variabilidade das espécies silvestres do gênero, especialmente para o melhoramento da espécie cultivada *A. hypogaea*, necessita primeiramente passar pela caracterização do germoplasma.

A linha de pesquisa de recursos genéticos vegetais do BAG-*Arachis* atua nas mais diversas frentes, desde o planejamento e estratégias de coleta, até as etapas de conservação que envolve: introdução e intercâmbio de germoplasma, coleta, caracterização, avaliação, documentação e conservação, sugeridas pela FAO em 1996, do germoplasma silvestre de *Arachis*.

Fundamentado nesta linha, o desenvolvimento desta tese alicerça a caracterização de novas espécies que apresentam uso potencial em pesquisa de características que podem ser introgrididas no melhoramento do amendoim.

A incorporação de genes de espécies silvestres ao amendoim é uma etapa inicial de pré-melhoramento, em uso crescente no melhoramento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), espécie tetraplóide com fórmula genômica proposta do tipo AABB. O aporte de genes de seus parentes silvestres tem se concentrado em espécies diplóides que compartilham o genoma “A”. Historicamente, isso se devia à baixa disponibilidade de acessos diplóides com o genoma “B”, por muito tempo considerado restritos ao sudoeste da Bolívia.

A descoberta de acessos brasileiros de *A. gregoryi*, *A. magna* e *A. valida*, nas últimas duas décadas, e de acessos de *A. williamsii* da Bolívia, abriu a perspectiva de introgressão de características genéticas das espécies do genoma “B”, mas exige melhor conhecimento da diversidade das relações dessas espécies e acessos.

Devido a características botânicas muito próximas, entre as espécies alvo do estudo, não fica clara a distinção entre os vários acessos coletados de *A.*

gregoryi e *A. magna*, podendo ainda alguns desses acessos ser mais relacionados a outras espécies próximas. Paira ainda uma dúvida se o único acesso de *A. ipaënsis* é ou não conspecífico com *A. magna*. Quanto maior for à similaridade dos acessos do germoplasma brasileiro desses grupos com *A. ipaënsis* e as formas bolivianas de *A. magna*, maior será seu valor potencial para o melhoramento do amendoim.

Os acessos das espécies citadas foram selecionados por serem da secção taxonômica *Arachis*, o que indica alta possibilidade de se cruzarem com *A. hypogaea*¹, além de serem espécies anuais, com alta produtividade e indícios de caracteres de resistência que são desejáveis em programas de melhoramento.

Evidentemente, são necessários estudos para valorizar, apontar e selecionar as características que possam ser úteis para esses acessos de germoplasma.

¹ Como existem várias espécies de amendoim que são cultivadas, no contexto desta tese, toda a vez que houver uma referência ao amendoim cultivado, o texto irá referir-se à espécie *Arachis hypogaea*. Qualquer menção a outra espécie de amendoim cultivado, que não seja referente *A.hypogaea*, haverá uma correta identificação da espécie citada.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL

Caracterizar as relações taxonômicas e genéticas entre acessos de quatro espécies silvestres de *Arachis* – *A. magna*, *A. gregoryi* - espécies brasileiras - e, *A. ipaënsis* e *A. williamsii*, exclusivamente bolivianas, diretamente associadas ao genoma “B” de *A. hypogaea*.

2.2- ESPECÍFICOS

- Verificar a cruzabilidade entre os acessos de *A. gregoryi*, *A. ipaënsis*, *A. magna* e *A. williamsii*;
- Confirmar a hibridação por meio de marcadores morfológicos e/ou moleculares;
- Analisar a viabilidade do grão-de-pólen dos parentais e dos híbridos;
- Testar a viabilidade de germinação das sementes obtidas de híbridos férteis;
- Verificar, através das metodologias descritas acima, a necessidade de fundir ou ampliar as espécies alvo de estudo;
- Analisar, por meio de marcadores moleculares microsatélites, o grau de relacionamento genético e verificar se a estrutura molecular corresponde à classificação taxonômica entre os acessos;
- Analisar por meio da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) acessos de *A. gregoryi*, *A. ipaënsis*, *A. magna* e *A. williamsii* para estudos comparativos de seus genomas.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- O MELHORAMENTO GENÉTICO DO AMENDOIM NO BRASIL

O melhoramento genético de plantas é uma ciência multidisciplinar, à qual a humanidade deve grande parte do seu sustento, e que procura agregar, nas cultivares em vias de lançamento, boas características adicionais às já disponíveis, ou características que compensem perdas devidas à erosão genética, à evolução dos patógenos, a problemas de indisponibilidade ou custos crescentes de insumos ou múltiplas outras causas que determinem insatisfação com as cultivares em uso (Valls, 2003).

O amendoim é uma oleaginosa, de grande valor nutricional como fonte de proteína, rico em óleo e vitaminas E e do complexo B sendo já documentada em achados arqueológicos de mais de 3.700 anos (Hammons, 1994). A cultura é de grande importância, especialmente para China, Índia e Estados Unidos que estão entre grandes produtores mundiais. Em 1974, a cultura passou a fazer parte dos programas internacionais de pesquisa do ICRISAT (International Crops Research for the Semi-Arid Tropics) e, em 1975, o IPP (International Peanut Program) da Universidade da Flórida indicou a necessidade de estabelecimento de três centros internacionais de germoplasma de amendoim, a fim de evitar a erosão genética neste grupo vegetal (Sichmann et al., 1976)

As atividades de melhoramento do amendoim no Brasil tiveram início na década de 30, no IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) (Godoy et al., 1999). Um apreciável acervo de conhecimentos básicos sobre o amendoim cultivado e de algumas espécies silvestres, indispensáveis para qualquer trabalho de melhoramento, foi realizado por Cândida Helena Teixeira Mendes Conagin nas décadas de 50 e 60. O IAC também realizava avaliação da coleção de linhagens e cultivares do material introduzido de *A. hypogaea* quanto às doenças mais comuns que atacavam a cultura, ressaltando que para algumas doenças a resistência

poderia ser encontrada na coleção de espécies do gênero *Arachis* (Sichmann et al., 1976)

Tradicionalmente, o melhoramento da espécie foi concentrado nos acessos das subespécies de *A. hypogaea* que, apesar de se reproduzirem por autogamia, apresentam segregantes com suficiente variabilidade para um programa de melhoramento (Simpson et al., 1992; Krapovickas & Gregory, 1994; Williams, 1996). No Brasil, esta premissa não foi diferente, sendo que os programas de melhoramento baseiam-se, principalmente na variabilidade genética encontrada dentro da espécie cultivada de *A. hypogaea*, ficando, os genes disponíveis nas espécies silvestres, limitadamente utilizados nos programas de melhoramento (Santos et al., 2005).

No Brasil, o programa de melhoramento se concentrou nas cultivares “Tatu” e “Roxo”, de origem pouco conhecidas, com seleções individuais, pois as populações dessas cultivares poderiam ser constituídas de uma mistura de linhas puras que se formaram através dos anos por cruzamentos naturais e mutações. Essas cultivares teriam, portanto, material de alto e baixo potencial genético (Sichmann et al., 1976).

Atualmente o Brasil produz aproximadamente 300 mil toneladas de amendoim (Figura 1), sendo uma atividade agrícola tradicional, que concentra 82% da produção nacional no Estado de São Paulo (Santos et al., 2005).

A produção de amendoim no nordeste brasileiro vem aumentando nas duas últimas décadas, em grande parte pela desistência da cotonicultura pelos pequenos e médios agricultores, devido a problemas econômicos causados pelo bicudo (*Anthonomus grandis* Bohem. 1843). Além disso, os fatores que favoreceram a cultura do amendoim na região foram: a) o ciclo relativamente curto da cultura; b) a adaptação às condições hídricas da região; c) o baixo custo de produção; d) a contribuição na melhoria da qualidade do solo, por ser uma leguminosa; e) o uso em cultivo consorciado com outras herbáceas; f) o uso na recuperação de canaviais edaficamente desgastados pela monocultura; g) e devido a demanda do produto no mercado regional (Santos et al., 2005).

O interesse pela cultura do amendoim no cerrado brasileiro surgiu no início de 2000, pelo aproveitamento dos maquinários das grandes lavouras, como soja e milho. Com o bom desempenho da cultura, associado com alta produtividade e a qualidade do produto, a cultura tornou-se mais uma fonte de renda para a economia regional (Santos et al., 2005).

No Brasil a produção de amendoim se destina para atender o mercado de alimento, na forma *in natura* ou na confecção de doces, confeitos, petiscos ou manteiga. O segmento oleoquímico é restrito, uma vez que sofreu, na década de 80, grandes modificações devido a sua substituição pelo óleo de soja (Godoy et al., 1999).

Segundo o Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/RNC_13_09_2006_13_09_2006.htm (página acessada em 06/10/2006), no período compreendido entre 01/01/1998 a 19/09/2006, existem 14 cultivares de amendoim, *A. hypogaea*, registradas para o cultivo e produção de grãos no Brasil (Tabela 1).

As cultivares BR 1, BRS 151-L7 e BRS Havana foram desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. As cultivares IAC 5, IAC 22, IAC 8112, IAC Oirã, IAC Poitara, IAC Tupã, IAC Tupã, IAC Caiapó, IAC Tatú-ST, Tatu Vermelho e Runner IAC 886 foram desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. A cultivar IAPAR 25 (Ticão) foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR.

Os principais problemas da cultura estão relacionados ao ataque de pragas e doenças. As doenças foliares que ocorrem na cultura do amendoim podem causar queda de até 50% na produção (Moraes & Godoy, 1985). Vários países como a Índia, Argentina, Estados Unidos e Brasil, percebendo o potencial das espécies silvestres e sua ampla diversidade genética, passaram a utilizar tais espécies de *Arachis* como fonte de resistência para as moléstias da cultura. Segundo Leal-Bertioli et al., (2003), espécies silvestres de *Arachis* têm-se mostrado altamente promissoras como fonte de resistência à pragas e doenças, e vale a pena ressaltar, que a maioria das espécies silvestres de *Arachis* são brasileiras.

Tabela 1: Cultivares de amendoim, *Arachis hypogaea*, registradas no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura no período de 01/01/1998 a 19/09/2006.

Cultivares
BR 1
BRS 151-L7
BRS Havana
IAC 5
IAC 22
IAC 8112
IAC Oirã
IAC Poitara
IAC Tupã
IAC Caiapó
IAC Tatu-ST
IAPAR 25 (Ticão)
Runner IAC 886
Tatu Vermelho

A partir da década de 80, foram intensificados os trabalhos de coleta de germoplasma de *Arachis* no Brasil, coordenados pela EMBRAPA/CENARGEN, o que contribuiu para ampliar a variabilidade na coleção do germoplasma (Valls et al., 1985). Esse esforço resultou num importante aporte de variabilidade para a crescente tendência de utilização dos parentes silvestres nos programas de pré-melhoramento e melhoramento do amendoim.

As espécies silvestres, apesar de, na maioria, serem diplóides com $2n=20$, apresentam características de grande utilidade para serem incorporadas na espécie cultivada, como resistência a doenças, ao estresse hídrico, qualidade nutricional das sementes, entre outras (Santos et al., 2005).

Isso porém, resulta na necessidade de haver maior entendimento das relações de cruzabilidade intra e interespecíficas entre os acessos das espécies silvestres de *Arachis* para poder-se selecionar características que sejam de interesse para o melhoramento do amendoim cultivado.

Nessa direção, um importante projeto que solidificou a união do uso dos parentes silvestres do amendoim para introdução de características de interesse desses materiais para a cultura do amendoim cultivado foi realizado por Fávero

(2004) e Fávero et al., (2006), a qual buscou junto aos melhoristas de amendoim, levantar as características que estes desejavam introgridir nas suas cultivares. A partir disso, foi realizada uma série de avaliações fitopatológicas de resistência às doenças foliares nos materiais silvestres e, dentre aqueles em que foi evidenciada resistência, houve a seleção dos acessos que entraram para um programa de cruzamentos, a fim de estudar a introgressão de tais características para a espécie cultivada, através da produção de anfidiplóides.

Uma grande vantagem, para o país, referente aos programas de pré-melhoramento e melhoramento do amendoim, é que o Brasil é um grande detentor de germoplasma das espécies silvestres, as quais podem ser usadas em tais programas, para introduzir características de interesse desejadas de seus parentes silvestres para essa cultura.

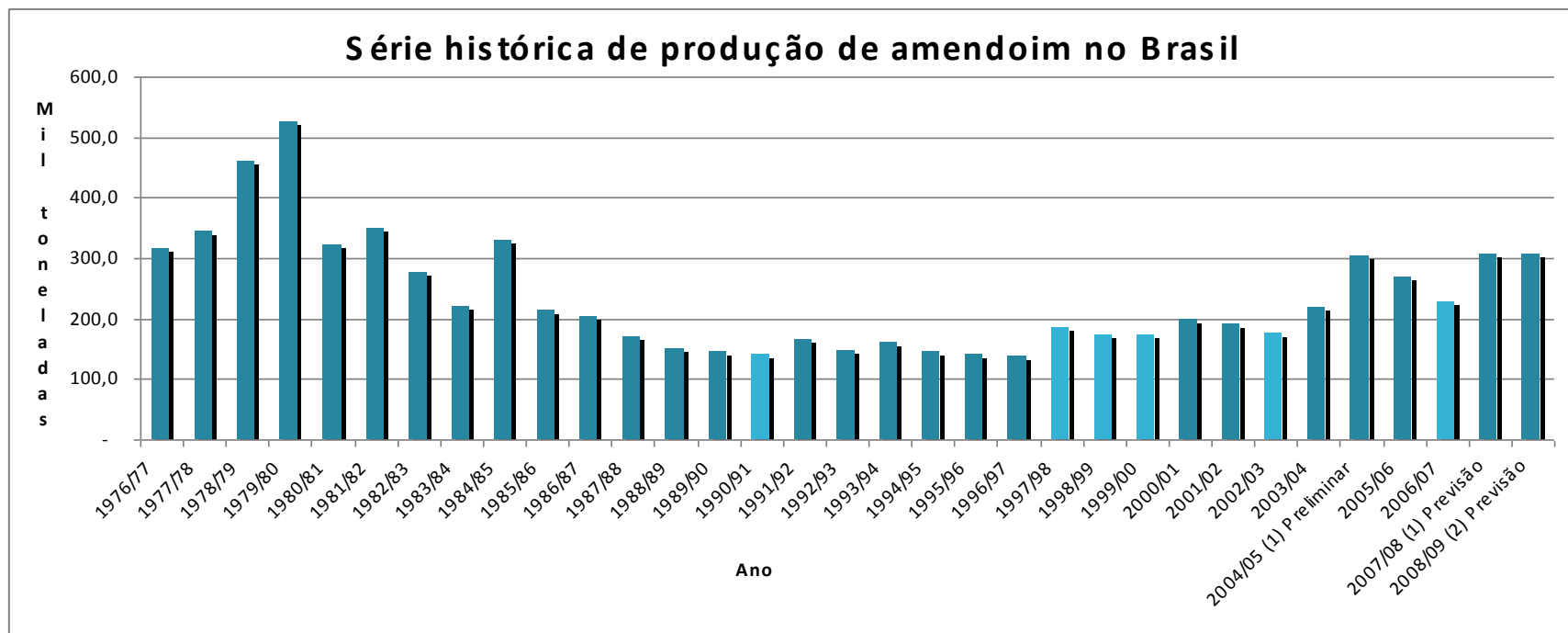


Figura 1: Série histórica de produção de amendoim no Brasil em mil toneladas por ano.

3.2- O GÊNERO *ARACHIS*

A descrição do gênero *Arachis* foi feita por Linnaeus (1753), considerando apenas uma espécie, *A. hypogaea*, o amendoim.

As primeiras cinco espécies silvestres de *Arachis* foram descritas por Benthham (1841). Mais tarde, em 1859, Benthham considerava a existência de sete espécies no Brasil, incluindo *A. hypogaea*.

Um ensaio de classificação taxonômica foi feito por Chevalier (1929a), tentando relacionar e agrupar as espécies de acordo com o que ele chamou na época de raças e formas afins. Ainda em 1929, descreveu *A. hypogaea* subespécie *sylvestris*, considerando esta subespécie como um ancestral de algumas variedades do amendoim *A. hypogaea*. Chevalier foi o primeiro a ilustrar o fruto subterrâneo de uma espécie silvestre constituído de apenas um segmento de fruto. Em 1933, o mesmo autor, foi o primeiro a elaborar uma chave de classificação utilizando caracteres vegetativos, tanto aéreos como subterrâneos, para distinguir as espécies até então conhecidas.

Estudando os exemplares argentinos e seguindo os mesmos critérios de Chevalier, Burkart (1939) reconhece cinco espécies, porém com os elementos disponíveis na época, não pode interpretar corretamente os nomes. Foi o primeiro a descrever e ilustrar um fruto biarticulado correspondente a *A. monticola* e, mais tarde (1942), os de *A. villosa*, observando os exemplares cultivados.

Ao longo dos anos, novas espécies foram descritas e Hoehne (1940) publicou uma revisão do gênero, utilizando coleções vivas e exsiccatas, reconhecendo 11 espécies, algumas com numerosas formas, a qual descreveu sem a diagnose latina e, portanto, com nomes inválidos depois de 1931, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Esta revisão foi baseada quase que exclusivamente nas características dos folíolos. Apesar das boas ilustrações das características vegetativas, tanto aéreas como subterrâneas, o autor não levou em conta as características subterrâneas para classificar as

espécies. Utilizando o trabalho de Hoehne para a descrição dos materiais citados, Mendes (1947) determinou o caráter diplóide de várias espécies silvestres.

Uma nova sinopse do gênero foi publicada por Hermann (1954), baseada apenas em novas coleções e tentando conciliar os critérios de Chevalier, Burkart e Hoehne.

Ainda hoje é muito difícil uma correta interpretação taxonômica das espécies de *Arachis*, devido a sua similaridade. Muitas das espécies hoje conhecidas eram classificadas sob um mesmo nome, porque as descrições eram baseadas apenas em exsiccatas, quase sempre coletadas sem as partes subterrâneas, de grande valor diagnóstico no gênero.

Para uma correta classificação das espécies de *Arachis*, é necessário dispor de informações sobre a planta viva e seus hábitos, bem como estudos sobre cruzamentos interespecíficos e citogenéticos. Com base nesses critérios e, dispondo ainda de informações cromatográficas e palinológicas, Krapovickas & Gregory (1994) publicaram uma monografia sobre o gênero, incluindo 69 espécies, 44 das quais novas para a ciência.

Outras 11 novas espécies de *Arachis*, não contempladas pela revisão do gênero em 1994, foram publicadas por Valls & Simpson (2005), totalizando 80 espécies descritas.

O gênero *Arachis* está atualmente dividido em nove seções (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Triectoides* e *Triseminatae*), segundo sua morfologia, o modo de reprodução e o modo de dispersão ao longo da América do Sul (Krapovickas & Gregory, 1994). Todas as seções ocorrem no Brasil. Das 80 espécies descritas, 64 ocorrem no Brasil, sendo 47 exclusivas da flora brasileira.

Em 1973, Gregory et al., tentaram ordenar as espécies da seção *Arachis*, em três séries: espécies perenes diplóides (série *Perennes*); espécies anuais diplóides (série *Annuae*) e espécies anuais tetraplóides (série *Amphiploides*). Porém, com os resultados de cruzamentos realizados, esta divisão não ficou bem estabelecida, sendo que existe maior afinidade genética entre algumas espécies perenes e anuais do que outras espécies agrupadas dentro da mesma série.

Um bom exemplo desta situação é mostrado para a secção *Arachis*. Esta apresenta como característica a ocorrência de várias espécies anuais, fato que também ocorre em toda a secção *Heteranthae*; flores dispostas ao longo de ramos muito longos, o que facilita a conquista de novos ambientes e, o pericarpo do fruto ser muito reticulado (Krapovickas & Gregory, 1994).

Atualmente, não vem sendo utilizada uma subdivisão formal para as espécies da secção *Arachis* que, em geral, vem sendo associadas aos distintos genomas (A e B) de *A. hypogaea* (fórmula AABB), como, respectivamente, espécies “de genoma A”, ou seja, aquelas espécies diplóides com $2n=20$ e semelhantes ao chamado “genoma A” do amendoim, caracterizado por um par de cromossomos nitidamente menor que os demais nove pares; “de genoma B”, reunindo diplóides com $2n=20$, mas sem o par pequeno, e ainda as espécies tetraplóides, *A. hypogaea* e *A. monticola* (Valls, 2006).

Acredita-se que o gênero tenha-se originado no Planalto Central Brasileiro, em área correspondente ao sudoeste de Goiás e Mato Grosso do Sul até a fronteira com o Paraguai. Nesta área, onde se encontram *A. tuberosa* e *A. guaranítica*, as espécies mais primitivas do gênero, assim consideradas devidas as suas características morfológicas como as folhas trifolioladas de *A. tuberosa* e, dos folíolos lanceolados de *A. guaranítica* (Krapovickas & Gregory, 1994).

3.3.- CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA

Segundo Krapovickas & Gregory (1994), somente a caracterização exomorfológica das plantas não é suficiente para estabelecer, com precisão, as delimitações entre as espécies de *Arachis*, sendo necessário reunir dados citogenéticos.

Segundo Husted (1933) o primeiro a reportar o número cromossômico haplóide (20) e diplóide (40) de *A. hypogaea* foi Kawakami (1930). O próprio Husted, em 1931, determinou os cromossomos somáticos da espécie brasileira *A.*

nambyquarae e de seis variedades de *A. hypogaea*. Já nessa época Waldrom (1919) sugeriu que a espécie cultivada era derivada de espécies silvestres como *A. pusilla* e *A. prostrata*.

Ainda em 1933 Husted relatou que as diferenças cromossômicas não se limitavam apenas ao número, mas também quanto ao tamanho e forma dos cromossomos e que novas investigações citogenéticas em espécies silvestres eram necessárias para estabelecer os ancestrais do amendoim cultivado.

Ao estudar a morfologia dos cromossomos de *A. hypogaea*, Husted (1933) identificou um par de cromossomos de pequeno tamanho. Já em 1936 Husted nomeou este par de cromossomos pequeno de par “A” e, um segundo par de “B” devido à presença de constrições subterminais e uma atípica e longa constrição secundária.

Em preparações mitóticas, os cromossomos do par “A” se mostram apenas levemente corados durante a prófase, exceto na região proximal, onde a coloração é mais intensa. Já na metáfase, apresentam coloração similar aos demais cromossomos Fernández & Krapovickas (1994), porém com tamanho nitidamente menor.

Com base no tamanho relativo do satélite e na posição do centrômero, Fernández & Krapovickas (1994) classificaram os cromossomos “SAT” em 10 tipos. Para facilitar a descrição, os cromossomos “SAT” foram divididos em braço 1 e braço 2, sendo esses braços separados pelo centrômero. Conforme o esquema (Figura 2), o braço 2 foi dividido em segmento proximal ao centrômero e segmento distal (satélite) entre estas duas partes está a constrição secundária, (Fernández & Krapovickas, 1994).

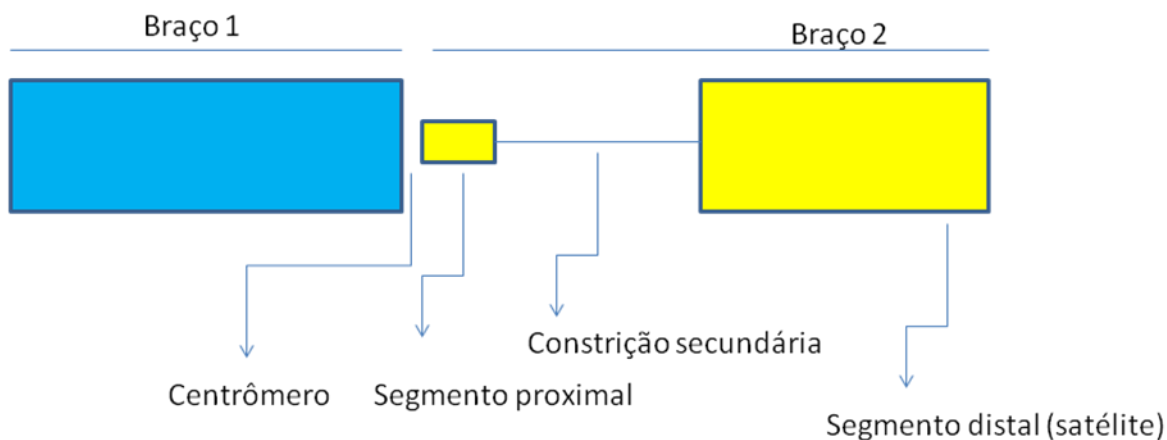


Figura 2 – Morfologia do cromossomo “SAT”. Adaptado de Fernández & Krapovickas (1994), página 196.

Em trabalho publicado sobre o gênero em 1994, Fernández & Krapovickas realizaram um levantamento de dados sobre os cromossomos e a evolução em *Arachis*. Eles analisaram, nas fases mitóticas, a morfologia dos cromossomos, especialmente a do par “A” e do cromossomo satelitado de 40 espécies silvestres que correspondem a 135 acessos e de quatro acessos do amendoim cultivado.

No decorrer dos anos, vários trabalhos foram publicados sobre a citogenética do gênero *Arachis*. No trabalho de Lavia (1996, 1998) são apresentados os cariótipos de duas espécies, *A. palustris* e de *A. praecox*, que apresentam $X=9$ como número básico de cromossomos. E, Peñaloza & Valls (1997), encontraram o mesmo número para *A. decora*.

A análise meiótica também tem sido alvo de pesquisa uma vez que esse tipo de estudo constitui um dos primeiros passos para o conhecimento do genoma do gênero. A análise meiótica realizada por Lavia et al., (2001) demonstra pela primeira vez o comportamento, entre outras, da espécie *A. williamsii*, com 10 bivalentes e viabilidade de pólen de 99,80%.

Recentemente a citogenética molecular passou a contribuir para o melhor entendimento das relações entre as espécies do gênero, especialmente com os trabalhos de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e hibridização genômica *in situ* (GISH) de Seijo et al., (2004, 2007) e de Robledo & Seijo (2008).

A técnica de hibridização *in situ* (ISH) foi desenvolvida há 40 anos por Gall & Pardue (1969) e John et al., (1969), mas somente a partir da década de 80 despertou maior interesse na pesquisa científica. Com a implementação de técnicas de bandeamentos Q, G, e C, esta última mostra a região centromérica, ou por coloração com fluorocromos específicos como DAPI (reconhece sítios ricos em AT) e CMA (reconhece sítios ricos em CG) permitiram a visualização de regiões heterocromáticas específicas (Guerra, 2000).

A hibridização *in situ* por fluorescência é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de sondas específicas que podem estar associadas a moléculas radioativas fluorescentes, o que permite sua melhor visualização. As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. As sondas podem estar representadas no cromossomo uma única vez ou repetidas várias vezes, sendo chamadas de seqüências repetidas em tandem. As seqüências são de DNAs satélites, gene que codifica o RNA ribossomal 5S e a seqüência que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S. Estes genes, 5S e 45S foram bem conservados durante o processo evolutivo vegetal (Gerlach e Bedbrook, 1979).

A técnica baseia-se no fato de que o DNA formado por duas fitas é desnaturado, e durante a renaturação as sondas disponíveis no meio em torno do cromossomo competirão com as fitas de DNA cromossômico e serão hibridizadas *in situ*, ou seja, na localização específica onde àquela sonda ocorre naturalmente.

A técnica pode ser utilizada para localizar diferentes seqüências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina (Dong et al., 2001). A hibridização fluorescente *in situ* possibilita a localização simultânea ou sucessiva de uma ou mais sondas de DNA ao longo do cromossomo. Esse procedimento produz marcadores cromossômicos, que podem ser usados na identificação de genomas, cromossomos ou de regiões cromossômicas específicas.

3.4.- A ORIGEM DOS GENOMAS A E B DO AMENDOIM

A discussão sobre a origem do amendoim na literatura das últimas três décadas apresenta diferentes versões sobre quais seriam os materiais silvestres que, num passado remoto, teriam se cruzado, produzido um híbrido estéril que se duplicou naturalmente, restaurando a fertilidade e, que culminou com o surgimento da espécie *A. hypogaea*. Outra dúvida recorrente é se esse processo ocorreu apenas uma vez na natureza ou se ele se repetiu em diferentes locais, envolvendo ou não diferentes espécies e quais seriam as espécies envolvidas nesse processo.

Foram realizados diversos cruzamentos interespecíficos a fim de estabelecer as relações de afinidade entre *A. hypogaea* e as espécies silvestres, iniciando pelo cruzamento realizado por Gregory (1946), envolvendo as únicas espécies tetraplóides com germoplasma disponível naquela época com a utilização da cultivar NC Bunch de *A. hypogaea* x *A. glabrata*, cujas sementes, porém não se desenvolveram.

Por muito tempo, *A. batizocoi* foi considerado como a possível fonte do genoma B de *A. hypogaea*. A obtenção de novos acessos de germoplasma e sua submissão cada vez mais intensa às técnicas de caracterização morfológica, citogenética e molecular (Stalker, 1990; Kochert et al., 1991; Fernández & Krapovickas, 1994; Stalker et al., 1994) levaram, em pouco tempo, à exclusão de *A. batizocoi* como provável espécie doadora do genoma sem o “par A” na origem de *A. hypogaea* (genoma “não-A ou B”) e a sugestão de *A. ipaënsis* como a mais provável doador desse genoma e de *A. duranensis* como espécie doadora do genoma A (Kochert et al., 1991). Esta idéia foi respaldada por Fernández & Krapovickas (1994), Kochert et al. (1996) e Seijo et al. (2004), este último levou a construção de um mapa físico mostrando, pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que os prováveis progenitores silvestres de *A. hypogaea*, sejam *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. A viabilidade deste cruzamento foi demonstrada através da produção de um anfidiplóide desses dois genitores

propostos e seu cruzamento bem sucedido e fértil com representantes das seis variedades botânicas de *A. hypogaea* por Fávero et al. (2006).

3.5- HIBRIDAÇÃO EM *ARACHIS*

O gênero *Arachis* apresenta uma ampla variabilidade agrupada tanto dentro como entre as secções que a compõem. Uma das ferramentas utilizadas pelos pesquisadores, para tentar desvendar e compreender toda esta complexidade existente no gênero, é a hibridação.

Apesar de a hibridação ser uma técnica utilizada, classicamente, para criar variabilidade nos programas de melhoramento, aqui ela é utilizada para precisar a delimitação taxonômica de alguns acessos das espécies alvo do estudo.

Através da produção de híbridos, intra e interespecíficos análises citogenéticas, morfológicas e moleculares podem ser estabelecidas inferências de grande valor taxonômico sobre o gênero.

A secção *Arachis* é a secção evolucionariamente mais avançada e de maior interesse para os melhoristas de plantas, que buscam encontrar variabilidade para ser usada nos programas de melhoramento do amendoim cultivado, o qual pertence a esta secção (Simpson & Valls, 2006).

O primeiro registro de um híbrido interespecífico em *Arachis* foi feito em 1938 por Hull e Carver entre *A. hypogaea* e *A. glabrata* e entre *A. hypogaea* e três outras espécies silvestres não identificadas. Em 1946, W. C. Gregory refez o cruzamento entre *A. hypogaea* e *A. glabrata* e nenhuma semente híbrida foi recuperada; fez ainda cruzamentos entre *A. hypogaea* e *A. villosulicarpa* e *A. hypogaea* e *A. sp* (na época erroneamente identificada como *A. diogo*). Em cada um desses casos o fruto foi obtido, porém continham apenas sobras escurecidas das sementes abortadas logo no início de seu desenvolvimento. Mais tarde, W. C. Gregory conseguiu um lote de sementes do cruzamento entre *A. hypogaea* e *A. glabrata*, no entanto, ao germinar tais sementes, somente plantas de *A. hypogaea*

foram obtidas, ou seja, o que havia sido reportado como material híbrido era na verdade frutos provenientes de autofecundação (Gregory & Gregory, 1979).

O primeiro híbrido interespecífico triplóide ($2n=2x=30$), relatado na literatura, foi feito em 1949 por Krapovickas e Rigoni, ao cruzar *A. correntina* ($2n=2x=20$) x *A. hypogaea* ($2n=2x=40$). Logo a seguir, em 1951, estes mesmos pesquisadores encontraram a primeira espécie silvestre com igual número de cromossomos que o amendoim cultivado, *A. monticola*, inicialmente identificada sob outro nome, mas em 1957 a descrevem e obtiveram híbridos férteis ao cruzá-la com *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994).

No período compreendido entre 1963 e 1977, Gregory & Gregory (1979) realizaram 1075 diferentes tipos de cruzamentos entre 91 parentais, tanto dentro como entre secções do gênero *Arachis*, tendo sido obtidos 296 híbridos, sendo que, pelo menos, 126 destes foram entre espécies distintas, e oito híbridos foram de espécies da secção *Arachis* com o amendoim cultivado, onde nenhum híbrido foi obtido entre este material e uma espécie pertencente à outra secção. Dentro da secção *Arachis*, os cruzamentos foram realizados entre espécies anuais; anuais com perenes; anuais com tetraplóides; perenes com perenes e perenes com tetraplóides.

Essa série de cruzamentos acima citada, teve fundamental importância para estabelecer as relações taxonômicas do gênero *Arachis*.

No decorrer dos anos seguintes, vários experimentos de hibridação foram realizados envolvendo espécies silvestres, tanto no Brasil como em outros países, especialmente, na Argentina, Estados Unidos e Índia.

No Brasil destacam-se os trabalhos de hibridação entre espécies de *Arachis* iniciados por Pompeu (1983), envolvendo *A. hypogaea* e espécies silvestres da secção *Arachis*. Mais tarde, vários trabalhos abordaram espécies com potencial forrageiro, concentrando-se na secção *Caulorrhizae* (Oliveira & Valls 2002; Castro et al., 2007) e também estudando a cruzabilidade interseccional (Teixeira et al., 1998; Rodrigues, 2006). Fávero (2004) realizou novos cruzamentos entre espécies da secção *Arachis*, objetivando caracterizar espécies silvestres com resistência múltipla as doenças foliares e, portanto, mais resistentes que o amendoim

cultivado, para posterior introgressão de tais características, em ações de programa pré-melhoramento (Fávero et al., 2006).

3.6- MORFOLOGIA DA FLOR EM *ARACHIS*

A realização de cruzamentos entre espécies de *Arachis* presume um conhecimento razoável de suas estruturas reprodutivas, mas a maioria dos trabalhos de biologia floral do gênero refere-se ao amendoim cultivado.

De modo geral o florescimento tem início entre 14 e 55 dias após o plantio (Simpson et al., 1994). Em *A. hypogaea* a produção de flores é fortemente influenciada pelo fotoperíodo, sendo 12 horas de comprimento do dia o valor mínimo crítico para muitas espécies (Ketring, 1979).

A flor em *Arachis* surge a partir de inflorescência tipo espiga presente na axila foliar. Os botões florais em desenvolvimento tornam-se visíveis 36 a 48 horas antes da abertura das flores. Estes se apóiam no ápice de um cálice tubular, denominado hipânquio, o qual inicia um desenvolvimento acelerado, aproximadamente, 24 horas antes da antese (Figura 3).



Figura 3: Elongação do hipânquio e desenvolvimento do botão floral no amendoim. Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 8.

As flores são sésseis, possuindo o hipânquio bem desenvolvido e o cálice que envolve toda a estrutura da corola. A corola é papilionada compostas por uma pétala grande denominada estandarte, duas pétalas laterais denominadas de asas e duas pétalas soldadas que constituem a quilha que protege os órgãos reprodutivos (Figura 4). Cada flor mostra oito estames (4 com anteras biloculadas, 4 anteras globosas) e 2 estaminódios (Figura 5). O pistilo da flor, que consiste em estigma, estilete e ovário. O estigma situa-se sobre a parte apical do estilete o qual percorre internamente todo o comprimento do hipânquio até o ovário, que se situa na inflorescência da axila foliar, e que pode ter de dois a três óvulos (Simpson et al., 1994).

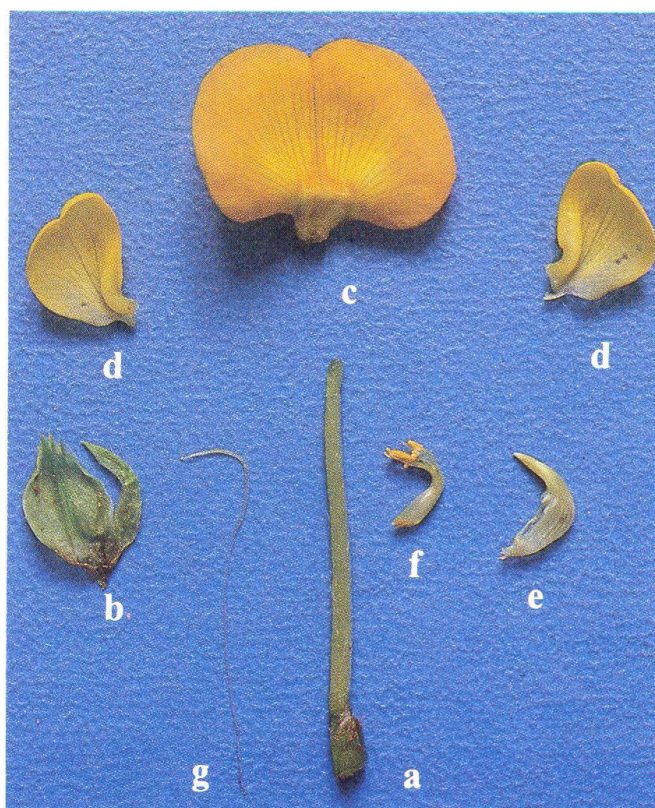


Figura 4: Flor de amendoim dissecada mostrando: (a) hipânquio, (b) sépalas, (c) estandarte, (d) asas, (e) quilha, (f) estames, (g) estigma e estilete. Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 7.



Figura 5: Três grupos de estames: (a) dois estaminódios estéreis, (b) quatro estames globosos com anteras dorsifixas e (c) quatro estames com anteras adnatas oblongas Adaptado de Nigam, S.N. et al., (1990), página 7.

Os grãos de pólen tornam-se maduros, aproximadamente, 6 a 8 horas antes da antese, mas a polinização não ocorre até que as flores estejam abertas, o que ocorre nas primeiras horas da manhã (Simpson et al., 1994). Segundo Conagin (1957) a fertilização em *A. hypogaea* é normal, ou seja, um dos gametas masculinos funde-se com a oosfera dando origem ao embrião e o outro se funde ao núcleo diplóide do saco embrionário para dar origem ao endosperma.

A fertilização ocorre 12 horas após a polinização e durante esse processo o hipânquio e a flor murcham. Após a fertilização o embrião sofre de quatro a cinco divisões e torna-se dormente. Ao mesmo tempo, o meristema intercalar torna-se ativo na base do ovário e inicia o crescimento do “peg”², que possui geotropismo positivo e ao penetrar no solo e, dependendo da espécie, pode sofrer espessamento ou tornar-se bastante fino. O comprimento do “peg” está sob controle genético e ambiental podendo variar de 1 a 2 cm para uma espécie da secção *Extranervosae* a mais de 1m na secção *Erectoides* e *Procumbentes*. Em

² Não existe uma descrição anatômica que defina especificamente a ontogenia da formação do “peg”. A descrição latina para o termo é Paxillum. Adotou-se neste trabalho usar o termo “peg” o qual, é usado rotineiramente no ambiente de pesquisa sobre o gênero.

A. hypogaea a atividade do meristema da base do ovário é sensível a luz, sendo que as divisões cessam após 24-36 horas após a ponta do “peg” se enterrar totalmente no solo (Simpson et al., 1994).

Segundo Santos et al., (1999), para *A. hypogaea*, a profundidade que o “peg” atinge é de, aproximadamente, 7 cm, podendo esta medida variar em função da textura do solo. O início da formação do fruto ocorre de sete a nove dias após a emissão do “peg” e a maturação completa de uma vagem, a partir da abertura da flor, requer cerca de 60 dias, e o período de desenvolvimento completo, da emergência à colheita, dependendo da variedade e da região plantada (tropical ou subtropical) apresenta uma variação de 85 até 160 dias.

Conagin (1959) realizou estudos para obter informações sobre o desenvolvimento dos frutos nas espécies selvagens de amendoim, uma vez que estas apresentam frutos diferentes da espécie cultivada. A espécie cultivada pode apresentar de 2 a 5 sementes justapostas dentro de um único fruto e nas espécies selvagens os frutos apresentam duas sementes, completamente separadas uma da outra por uma constrição de comprimento variável, denominada istmo. A partir desta característica Burkart (1939 e 1942) e Hoehne (1940) denominaram o termo de frutos catenados, ou seja, frutos nos quais suas sementes são separadas uma da outra por uma constrição muito profunda ou mesmo um istmo de comprimento variável.

Porém, para a espécie silvestre *A. triseminata* é comum encontrar frutos bi ou tri articulados (Krapovickas & Gregory, 1994) e até mesmo tetra ou penta articulados como em *A. giacomettii* (comunicação pessoal Dr. J.F.M. Valls, 2006).

Nas espécies selvagens o ovário unilocular, tem normalmente dois óvulos. A separação das duas sementes tem origem no meristema intercalar que se forma nos ovários jovens e que separa em duas a cavidade inicialmente única. Este tecido se desidrata durante o processo de amadurecimento do fruto, tornando-se quebradiço, por essa razão quando os frutos são colhidos a maioria deles se rompe e apresentam-se unisseminados, dando uma idéia errônea desta característica.

3.7- DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ALVO DO ESTUDO DE CRUZABILIDADE

Abaixo são descritas as espécies alvo do estudo. Nesse trabalho serão utilizadas outras espécies do gênero *Arachis* que funcionarão como ferramentas para a interpretação da caracterização do germoplasma listado nos objetivos. Outras informações sobre tais espécies podem ser encontradas em Krapovickas & Gregory, (1994) e em Valls & Simpson, (2005).

3.7.1- *ARACHIS GREGORYI* C. E. SIMPSON, KRAPOV. & VALLS

Planta anual. Eixo central redondo em espécimes frescos, porém usualmente angular quando seco; altura entre 9-45 cm. Entrenós com 6-28 mm de comprimento com muitos pêlos de 2 mm e muitas cerdas. Folhas tetrafolioladas, folíolos com pêlos no topo muito curtos em tecidos jovens, pêlos muito finos, longos na margem e na parte de baixo do folíolo. Com poucas cerdas na margem dos folíolos. Pecíolo e ráquis do eixo central longo com muitos pêlos e cerdas. As estípulas do eixo central com muitos pêlos ásperos na margem, mas em geral com cerdas na superfície de fora. Na superfície das estípulas com nenhum pêlo ou cerda. Poucas cerdas na parte livre das estípulas. Ramos laterais arredondados em espécimes frescos e angulares quando secos. Entrenós com muitos pêlos e cerdas. Folíolos dos ramos laterais elípticos. Folíolos com muitos pêlos curtos no ápice dos tecidos jovens e aparentemente glabros em tecidos maduros, com muitos pêlos finos e longos na parte inferior. Margem com pêlos, com poucas cerdas espalhadas. Pecíolos e ráquis longos, ambos com pêlos e cerdas. Estípulas dos ramos laterais com pêlos, mas com muitas cerdas abaixo dos pulvínulos (ou na parte adnata). Poucas cerdas esparsas na parte livre. Hipanto com numerosos pêlos finos. Cálice bilabiado com muitos pêlos e com cerdas. Estandarte laranja; asas amarelas, ambas glabras. Pegs com pêlos curtos na

parte aérea, porém sem cerdas. Frutos de 10 x 7 a 17 x 8 mm e geralmente liso com veios sutis, mas alguns grandes segmentos com leve a proeminente reticulação. Bico evidente. Frutos perdem o exocarpo na maturidade, expondo o endocarpo preto com veios pronunciados. Istmo com 12-23 mm de comprimento (Valls & Simpson, 2005).

A espécie cresce nas areias brancas cobertas por vegetação do cerrado no limite oeste do Estado do Mato Grosso, na fronteira com a Bolívia. A espécie prospera numa área que provavelmente é inundada em pelo menos uma parte do ano, durante a estação chuvosa. A espécie só havia sido coletada no Brasil, mas provavelmente também cresce na Bolívia, porque o sítio de coleta de diversos acessos se localiza, aproximadamente, 3-5 km da fronteira entre esses dois países (Valls & Simpson, 2005).

O número cromossômico foi determinado por Peñaloza & Valls, 2005 como tendo $2n=2x=20$.

3.7.2- *ARACHIS MAGNA* KRAPOV., W. C. GREG. & C. E. SIMPSON

Planta anual. Eixo central ereto, sem flores, ramos laterais procumbentes. Talo anguloso, piloso nas partes jovens, até sub-piloso, às vezes com setas presentes; entrenós do eixo central com até 55 mm de comprimento, e nos ramos laterais de 30 – 90 mm de comprimento. Folhas quadrifolioladas; no eixo central estípulas com a porção soldada de 14-19 mm de comprimento e a porção livre de 25-37 mm de comprimento; pecíolo 38-52 mm de comprimento; ráquis 10-17 mm de comprimento; folíolos oblongos às vezes levemente ovados. Nos ramos laterais, estípulas com a porção soldada de 8-9 mm de comprimento, a porção livre de 14-21 mm de comprimento, folíolos ovais ou obovados, levemente agudos a obtusos. Estípulas com a porção soldada mais ou menos pilosa a subglabra, com pêlos largos mais densos na linha dorsal e na base, também, há setas largas e espaçadas; porção livre com a face glabra ou com alguns pêlos largos e setas

até a base, margem ciliada. Pecíolo e ráquis canaliculados, pilosos. Face superior dos folíolos glabra, lisa; face inferior com a nervura média e margem marcada, com pêlos pequenos, esparcos e com pêlos largos sobre a nervura mediana e na margem. Flores ao longo dos ramos laterais, em espigas axilares muito curtas, de 5-7 flores. Hipanto de 5-7,5 cm de comprimento, piloso. Cálice bilabiado, piloso e com poucas setas largas. Estandarte laranja, raramente amarelo, alas amarelas. Fruto subterrâneo, biarticulado, peg 3-17 cm de comprimento, com largos pêlos muito esparcos na parte aérea; istmo de até 5 cm de comprimento, bico marcado, pericarpo reticulado com nervuras sobresalientes. Sementes 10-11 mm de comprimento por 5-6 mm de largura. O número cromossômico foi determinado por Fernández & Krapovickas, 1994 como tendo $2n=2x=20$.

3.7.3- *ARACHIS IPAËNSIS* KRAPOV. & W. C. GREG.

Planta anual. Raiz axonomorfa. Eixo central até 45 cm de comprimento, com poucos ramos na base. Os primeiros ramos cotiledonares começam com numerosas inflorescências agrupadas, que frutificam rapidamente e logo que o eixo se alarga formando ramos procumbentes de cerca de 50 cm de comprimento. Talos glabrescentes com as partes jovens parcialmente pilosas, com largos pêlos mais ou menos eretos cerca de 1,5 mm de comprimento; entrenós do eixo central até 75 mm de comprimento, entrenós dos ramos laterais até 55 mm de comprimento. Folhas quadrifoliadas, folíolos de obovados a elípticos. No eixo central a base soldada das estípulas mede de 7-13 mm de comprimento e nas partes livres 17-20 mm de comprimento, pecíolo em geral com 45 mm de comprimento, variando entre 35-53 mm, na ráquis 10 mm de comprimento, os folíolos distais de 38 mm de comprimento por 18 mm de largura, e até 45 mm comprimento por 25 mm de largura, e os folíolos proximais algo menores cerca de 33 mm comprimento por 15 mm de largura até 42 mm por 20 mm. Folhas dos ramos laterais com a parte soldada das estípulas de 3-5 mm de comprimento e a

parte livre de 9-10 mm de comprimento por 2 mm de comprimento, ráquis 7-10 mm de comprimento, par distal dos folíolos 23 mm comprimento por 18 mm de largura e o par proximal de 20 mm de comprimento por 14 mm de largura. Estípulas levemente imbricadas na base, face glabra, com alguns pêlos longos no dorso da porção soldada e ciliadas nas margens. Pecíolo, ráquis e pulvínulos com alguns pêlos longos, esparcos. Folíolo com epifilo glabro; hipófilo glabrescente, quando jovem com pêlos muito curtos, nervura média com alguns pêlos longos, margem não engrossada, ciliada raras vezes com algumas setas curtas. Flores ao longo dos ramos laterais e também agrupados na base. Hipanto piloso. Cálice bilabiado. Corola amarela. Fruto biarticulado; peg glabro, epicarpo reticulado com nervuras mais ou menos sobresalientes. A espécie apresenta $2x=2n=20$ cromossomos (Fernández & Krapovickas, 1994).

3.7.4- *ARACHIS WILLIAMSII* KRAPOV. & W. C. GREG.

Planta anual. Eixo central ereto cerca de 10 cm de altura, ramos laterais procumbentes, 35 cm de comprimento; talo quadrangular, piloso, pêlos 1,5-2 mm de comprimento. Folhas quadrifolioladas, estípulas pilosas até a base e com setas em quase toda a superfície, pecíolo e ráquis pilosos, epifilo liso, glabro, hipófilo com margem e nervuras pouco marcadas, pêlos pequenos na nervura mediana e na margem, onde também há algumas poucas setas curtas. No eixo central estípulas com a porção soldada de 10-12 mm de comprimento, porção livre 15-20 mm de comprimento por 2,5-4 mm de largura, pecíolo 30-35 mm de comprimento, ráquis 10 mm de comprimento, folíolos oblongos. Nos ramos laterais estípulas 8-11 mm de comprimento, porção livre cerca de 16 mm de comprimento por 3 mm de largura, pecíolo 12-20 mm de comprimento, ráquis 6-10 mm de comprimento, folíolos distais obovados, folíolos proximais oblongos. Hipanto piloso. Cálice piloso. Estandarte laranja. Fruto subterrâneo biarticulado, peg glabro ou com

alguns pêlos curtos nas partes expostas (Krapovickas & Gregory, 1994). Seu número cromossômico foi determinado como $2n=2x=20$ (Lavia, 1996).

3.7.5- *ARACHIS KRAPOVICKASII* C. E. SIMPSON, D. E. WILLIAMS, VALLS & I. G. VARGAS

Planta anual. Eixo central ereto com 28-48 cm de altura, entrenós com 5-45 mm; caules verdes arredondados, ou levemente angulares não quadrados; angulares quando secos. Folíolos do eixo central elíptico, com numerosos pêlos na parte inferior do folíolo, margem proeminente com muitos pêlos finos e poucas cerdas, que na margem ficam apontados para baixo e alguns com bulbos na base. Ápice dos folíolos é glabro. Pecíolos e ráquis com numerosos e finos pelos e muitas cerdas. Pulvínulos com pêlos. Estípulas do eixo central com pêlos na margem, poucas cerdas na superfície externa e glabra na interna. Muitas cerdas na parte adnata da estípula abaixo dos pulvínulos. Ramos laterais procumbentes, arredondados. Ramos laterais com muitas cerdas e grandes bulbos na base e muitos pêlos. Folíolos apicais ovados; folíolo basal elíptico. Folíolos dos ramos laterais com finos pêlos esparsos na superfície inferior, com muitos pêlos finos sobre o veio médio e nas margens e cerdas que são na parte inferior proeminentes na margem ou apenas na margem, muitos destas cerdas apontam para baixo. A superfície superior do folíolo é glabra. As estípulas apresentam pêlos na superfície externa e nas margens, também com cerdas. A superfície interna é glabra. O hipânquio e cálice com muitos pêlos. A parte posterior do cálice é tridentada e também com poucas cerdas. O estandarte é laranja com as asas amarelas. O peg com profusos pêlos na parte aérea. Algumas cerdas sobre os pegs. Frutos grandes e lisos, com alguns veios aparentes, mas reticulação muito suave. Os frutos parecem mais cilíndricos do que alongados. O bico é muito aparente (Valls & Simpson, 2005). Seu número cromossômico foi determinado como $2n=2x=20$ (Peñaloza & Valls, 2005).

A espécie cresce em areia branca friável ao sul das montanhas de Chiquitos e a leste dos Bañados del Izozog, numa área ao sul de San Jose de Chiquitos, Bolívia (Valls & Simpson, 2005).

4- MATERIAL

As sementes das espécies utilizados no trabalho foram fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis*, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

Na tabela 2 estão listados todos os acessos utilizados nas diferentes fases de desenvolvimento da tese, bem como seus dados de passaporte.

Os acessos utilizados em cada fase do trabalho são identificados juntamente com a metodologia usada. Os mapas de distribuição geográfica, das coletas realizadas em território brasileiro, das espécies silvestres e de seus acessos encontram-se plotados no anexo.

Tabela 2: Lista das espécies, com seus respectivos números de BRA, a sigla dos coletores, os acessos, a origem, o município e as coordenadas geográficas em graus, minutos e metros de cada um dos materiais utilizados no desenvolvimento da tese.

Espécie	BRA	Coletores	Acesso	Origem	Município	Lat	Long	Alt	Uso
<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C. Gregory	013315	K	9484	Bolívia	Parapeti	2005	6314	700	1, 2
<i>A. batizocoi</i> Krapov. & W.C. Gregory	013323	K	9484-mut	Bolívia	Parapeti	2005	6314	700	1
<i>A. benensis</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	037206	KGSPSc	35005	Bolívia	Trinidad (Aeropuerto)				1, 2
<i>A. cardenasii</i> Krapov. & W.C. Gregory	013404	GKP	10017	Bolívia	Roboré	1820	5946	200	1
<i>A. cruziana</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	036919	WiSVg	1302-2	Bolívia	S. J. Chiquitos - Tucavaca				1, 2
<i>A. cruziana</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	036919	WiSVg	1302-3	Bolívia	S. J. Chiquitos - Tucavaca				1
<i>A. decora</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	030970	V	13307	BRA-GO	Iaciara	1403	4650	450	1
<i>A. decora</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	030902	V	13290	BRA-GO	Monte Alegre de Goiás	1318	4642	510	1
<i>A. decora</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	022811	VSW	9955	BRA-GO	Campos Belos	1301	4642	690	1
<i>A. diogoi</i> Hoehne	039144	Vp	5000	BRA-MS	Corumbá	1750	5733		1, 2
<i>A. duranensis</i> Krapov. & W.C. Gregory	036200	VNvEv	14167	Argentina	Salta	2445	6526		1, 2
<i>A. glandulifera</i> Stalker	033774	VSPmSv	13738	BRA-MT	P. Esperidião (Buriti)	1613	5907	320	1, 2
<i>A. glandulifera</i> Stalker	038687	VOfSv	14730	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1524	6012		1, 3
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	012696	VSGr	6389	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1519	6006	210	1, 3
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038679	VOfSv	14728	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1524	6012		1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038695	VOfSv	14735	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1523	6011		1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038717	VOfSv	14739	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1524	6013		1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038725	VOfSv	14740	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1524	6013	310	1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038733	VOfSv	14743	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1527	6010		1, 3
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038768	VOfSv	14753	BRA-MT	Pontes e Lacerda	1559	5933	310	1, 2
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038792	VOfSv	14760	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1608	5947		1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038806	VOfSv	14765	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1605	5957		1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	038814	VOfSv	14767	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1605	5958	290	1, 2
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	040002	VS	14957	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1522	6014		1, 2, 3
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	040011	VS	14960	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1523	6013	245	1
<i>A. gregoryi</i> C.E.Simpson, Krapov. & Valls	040037	VS	14962	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1523	6013	250	1, 2
<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov. & Rigoni	024937	VPoJSv	10470	BRA-MT	Nossa Senhora do Livramento	1548	5621		1

Espécie	BRA	Coletores	Acesso	Origem	Município	Lat	Long	Alt	Uso
<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov. & Rigoni	012505	V	6325	BRA-MT	Santo Antonio do Leverger	1552	5604	150	1, 2
<i>A. helodes</i> Martius ex Krapov. & Rigoni	012572	V	6324	BRA-MT	Cuiabá	1536	5605		1
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	036226	KG	30006	BRA-MS	Corumbá, Baia Vermelha	1815	5728	100	1, 2
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	017388	VRGeSv	7612	BRA-MS	Corumbá/cult.CNPGC	1808	5730	90	1
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	022632	VPoBi	9094	BRA-MS	Corumbá	1934	5727	100	1
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	022641	VPoBi	9140	BRA-MS	Corumbá	1917	5722	100	1
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	022659	VPoBi	9146	BRA-MS	Corumbá	1914	5716	100	1, 3
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	034606	VMPzW	13985	BRA-MS	Corumbá	1931	5725	120	1, 2
<i>A. hoehnei</i> Krapov. & W.C. Gregory	037800	VRcMmSv	14547	BRA-MS	Corumbá	1931	5727	130	1
<i>A. hypogaea</i> (tipo Xingu) L.		VGaRoSv	12549	BRA-MT	Luciara				1, 2
<i>A. hypogaea</i> L.		Of	101						1
<i>A. hypogaea</i> L.		Of	117						1
<i>A. hypogaea</i> L.			13390						1
<i>A. hypogaea</i> L. subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>		VGaRoSv	12548	BRA-MT	Luciara				1, 2
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>peruviana</i> Krapov. & W.C. Greg.		Mf	1560	Argentina	Manfredi (origem Equador)				1, 2
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>vulgaris</i> C. Harz		cultivar	Tatuí	BRA-SP	Campinas (IAC)				1, 2
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> var. <i>aequatoriana</i> Krapov. & W.C. Greg.		Mf	1678	Argentina	Corrientes (origem Equador)				1, 2
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>fastigiata</i> Waldron var. <i>fastigiata</i>		cultivar	Tatu	BRA-SP	Campinas (IAC)				1, 2
<i>A. hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i> var. <i>hirsuta</i> Köhler		Mf	1538	Argentina	Corrientes (origem Equador)				1, 2
<i>A. ipaensis</i> Krapov. & W.C. Gregory	036234	KGBPScS	30076	Bolívia	Ipa (Quebr. Thaiguaté)	2100	6325	650	1, 2
<i>A. kempff-mercadoi</i> Krapov., W. C. Gregory & C.E. Simpson	030643	V	13250	Bolívia	Santa Cruz de la Sierra				1, 2
<i>A. krapovickasii</i> C.E. Simpson, D. E. Williams, Valls & I.G. Vargas	036901	Wi	1291	Bolívia	S. J. Chiquitos - Tucavaca	1814	6051		1, 2
<i>A. kretschmerii</i> Krapov. & W.C. Gregory	037818	V	14555	BRA-MS	Anastácio	2025	5602		1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	012611	V	6352	BRA-MT	Cáceres	1556	5748	130	1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	022551	V	9235	BRA-MS	Corumbá	1852	5611	100	1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	022586	V	9479	BRA-MS	Aquidauana	1955	5530	140	1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	020206	V	8887	BRA-MT	Porto esperidião	1537	5848	160	1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	033871	V	13779	BRA-MT	Cáceres	1613	5723		1, 2
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	038571	V	14691	BRA-MT	Cáceres	1603	5741		1
<i>A. kuhlmannii</i> Krapov. & W.C. Gregory	012645	V	6380	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1501	5956	195	1
<i>A. lignosa</i> (Chodat & Hassl.) Krapov. & W. C. Gregory	032808	V	13570	BRA-MS	Porto Murtinho	2132	5749	120	1

Espécie	BRA	Coletores	Acesso	Origem	Município	Lat	Long	Alt	Uso
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	036871	KGSSc	30097-o	Bolívia	San Ignacio de Velasco	1622	6058	370	1, 2
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	012718	VSGr	6396	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1530	6006	210	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	034011	VSPmSv	13765	BRA-MT	Cáceres	1548	5823	150	1, 2, 3
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	034011	VOfSv	14707	BRA-MT	Cáceres	1548	5823	150	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	033804	VSPmSv	13748	BRA-MT	Porto Esperidião	1616	5924	400	1, 3
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	033812	VSPmSv	13751	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1616	5927	430	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	033847	VSPmSv	13761	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1521	6004	380	1, 2
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	036218	VSPmSv	13761-C	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1521	6004	380	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	036285	VSPmSv	13761-Y	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1521	6004	380	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	033839	V	14724	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1519	6003	390	1, 2, 3
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	033847	V	14727	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1521	6004	380	1, 3
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	038741	VOfSv	14744	BRA-MT	Vila Bela S. Trindade	1528	6007	330	1
<i>A. magna</i> Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson	038750	VOfSv	14750	BRA-MT	Pontes e Lacerda	1554	5931	320	1, 3
<i>A. matiensis</i> Krapov., W. C. Gregory & C. E. Simpson	036943	V	13718	BRA-MT	Porto Esperidião	1607	5825	260	1, 2
<i>A. microsperma</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	017655	V	13545	BRA-MS	Bela Vista	2206	5631	180	1, 2
<i>A. monticola</i> Krapov. & Rigoni		SeSNHoCH	2775	Argentina	Lozano				1, 2
<i>A. palustris</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	036161	V	14156	BRA-TO	Miracema do Tocantins	927	4834	290	1
<i>A. palustris</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	030058	VPmSv	13023	BRA-TO	Filadélfia	725	4737	200	1, 2
<i>A. paraguariensis</i> Chodat & Hassl. Subsp. Paraguariensis	017621	VRGeSv	7677	BRA-MS	Bela Vista	2208	5644	220	1, 2
<i>A. pflugeae</i> C.E. Simpson, Krapov. & Valls	032875	VPzMW	14050	BRA-MS	Porto Murtinho	2144	5725	270	1
<i>A. praecox</i> Krapov., W.C. Gregory & Valls	012726	V	6416=14777	BRA-MT	Cáceres	1539	5715	215	1
<i>A. schininii</i> Krapov., Valls & C. E. Simpson	022926	V	9923	Paraguai	Bella Vista/Amambay	2223	5624	200	1, 2
<i>A. simpsonii</i>	033731	V	13728	Bolívia	San Matias	1619	5826	240	1, 2
<i>A. stenophylla</i> Krapov. & W.C. Gregory	034801	V	14026	BRA-MS	Caracol	2143	5700	480	1
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	024830	VSv	10309	BRA-MT	Rondonópolis	1628	5439	215	1, 2
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	034118	SvPzSz	3042	BRA-MT	Guiratinga/Est. de V. Rico	1623	5401	330	1
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	032476	VSStGdW	7805-AR	BRA-MT	São Félix do Araguaia	1138	5048	240	1
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	033511	WPz	421	BRA-TO	Alvorada/Rio Pau Seco	1236	4920	310	1
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	020389	VKSSv	9017	BRA-PR	S. Antonio do Leverger	1543	5542	170	1
<i>A. stenosperma</i> Krapov. & W.C. Gregory	037486	VCrSv	14455	BRA-MT	Paranaguá/Vila Portuária	2530	4831	5	1
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Gregory	022667	VPoBi	9153	BRA-MS	Corumbá	1911	5729	100	1, 3

Espécie	BRA	Coletores	Acesso	Origem	Município	Lat	Long	Alt	Uso
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Gregory	022675	VPoBi	9157	BRA-MS	Corumbá	1910	5726	90	1
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Gregory	032620	VPzRcSgSv	13514	BRA-MS	Corumbá	1907	5732	90	1, 2, 3
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Gregory	032646	VPzRcSgSv	13516	BRA-MS	Corumbá	1904	5729	70	1
<i>A. valida</i> Krapov. & W.C. Gregory	040410	VS	15096	BRA-MS	Corumbá	1918	5736		1
<i>A. vallsii</i> Krapov. & W.C. Gregory	017493	VRGeSv	7635	BRA-MS	Miranda	2007	5642	150	1, 2
<i>A. vallsii</i> Krapov. & W.C. Gregory	032638	V	13515	BRA-MS	Corumbá	1907	5732	90	1
<i>A. villosa</i> Benth	037125	VMilrLbGvAn	14309	BRA-RS	Uruguaiana	2947	5713		1, 2
<i>A. williamsii</i> Krapov. & W.C. Gregory	036897	WiDc	1118	Bolívia	Trinidad (Universidad)	1448	6452		1, 2

Abreviatura dos coletores: An= A. Carneiro; B= D. J. Banks; Bi= L. B. Bianchetti; C= C. L. Cristóbal; Cr= C. M. Castro; Dc= D. Claire; Ev= A. Echeverry; G= W. C. Gregory; Ga= M. I. Galgaro; Gd= I. J. Godoy; Ge= M. A. N. Garin; Gr= A. Gripp; Gv= F. R. Galvani; H= R. O. Hammons; Ho= D. Hojsgaard; Ir= B. E. Irgang; J= J. Jank; K= A. Krapovicas; Lb= L. R. M. Baptista; M= J. P. Moss; Mf= Manfredi; Mi= S. T. S. Miotto; Mm= M. Moraes; SN= V. Sólis-Neffa; Nv= L. Novara; Of= F. O. Freitas; P= J. R. Pietrarelli; Pm= R. N. Pittman; Po= A. Pott; Pz= E. A. Pizarro; R= V. R. Rao; Rc= R. C. Oliveira; Ro= D. M. S. Rocha; S= C. E. Simpson; Sc= A. Schinini; Se= G. J. Seijo; Sg= A. K. Singh; St= H. T. Salker; Sv= G. P. Silva; Sz= R. Schultze-Kraft; V= J. F. M. Valls; Vg= R. F. A. Veiga; Vp= V. J. Pott; W= W. L. Werneck; Wi= D. E. Williams.

1- acessos analisados molecularmente por microsatélites - SSR.

2- acessos envolvidos nos cruzamentos.

3- acessos analisados por hibridização *in situ* por fluorescência - FISH.

5- MÉTODOS

5.1- CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos durante os anos de 2006-2008 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

5.2- GERMINAÇÃO DOS ACESSOS

A germinação das sementes foi realizada sob condições de laboratório, em Câmara de Germinação TE – 40L/Tecnal a 25°C, com fotoperíodo de 10 horas de luz e 14 horas de escuro. As sementes antigas foram previamente tratadas com fungicida bissulfeto de tetrametiluram, na concentração de 1:5 (v/v) para evitar o crescimento de fungos que podem inviabilizar o desenvolvimento das plântulas. Logo a seguir foram, envolvidas em papel germiteste umedecido em solução de Ethephon (ácido 2-cloroetil fosfônico) 0,3%, para que ocorra a quebra de dormência das sementes e, mantidas no germinador.

Após a germinação, as plântulas foram transportadas para telado e transplantadas para copos plásticos com vermiculita ou em solo previamente preparado como substrato, numa proporção (3:1), três medidas de argila para uma de areia.

As plântulas foram mantidas nessas condições até atingirem maior desenvolvimento e vigor para serem plantadas em floreiras definitivas com 120x15x15 cm.

5.3- DELINEAMENTO DOS CRUZAMENTOS

Nos cruzamentos realizados no período de 2006/2008, a genitora foi *A. gregoryi*, acesso VS 14957. Durante o primeiro ciclo de cruzamentos, entre dezembro de 2006 a maio de 2007, foram realizadas 22 diferentes combinações e, no segundo ciclo, entre dezembro de 2007 a abril de 2008, 24 combinações de cruzamentos. A tabela 3 apresenta os acessos, as espécies envolvidas nos dois ciclos de cruzamento e, os respectivos genomas que representam essas espécies.

Cada um dos 46 cruzamentos foi realizado em vasos individuais. Em cada vaso de cruzamento as hibridações foram realizadas a partir do momento e até o final do período em que ambos os genitores estavam no seu período fértil, neste caso, produzindo flores.

O arranjo experimental dos genitores foi delineado de forma que em cada uma das quatro bancadas foram dispostos de 10 a 12 floreiras. Em duas dessas bancadas foram dispostos os vasos com os genitores femininos e nas outras duas os genitores masculinos.

Cada floreira da genitora recebeu duas etiquetas. Uma identificando o acesso da planta mãe e a outra identificando os genitores envolvidos no cruzamento.

Cada floreira do genitor masculino foi composta de duas plantas pertencentes ao mesmo acesso. Apenas uma das plantas foi a fornecedora de pólen. A outra planta foi mantida como cópia de segurança, caso o primeiro genitor masculino usado apresentasse algum problema como morte, finalização do período de produção flores ou ataque severo de pragas.

Tabela 3: Ciclos de cruzamentos realizados entre os anos de 2006/2007 e 2007/2008. Lista dos acessos, espécies e o genoma dos genitores envolvidos nos dois ciclos de hibridação.

Ano 2006/2007	V 14957 x	Espécie polinizadora	Genoma
	K 30076	<i>A. ipaënsis</i>	B ipae
	V 14753	<i>A. gregoryi</i>	B ipae
	V 14767	<i>A. gregoryi</i>	B ipae
	V14962	<i>A. gregoryi</i>	B ipae
	V 13761	<i>A. magna</i>	B ipae
	V 13765	<i>A. magna</i>	B ipae
	V 14724	<i>A. magna</i>	B ipae
	K 30097	<i>A. magna</i>	B ipae
	Wi 1118	<i>A. williamsii</i>	B ipae
	V 13514	<i>A. valida</i>	B ipae
	V 7635	<i>A. vallsii</i>	B vall
	K 9484	<i>A. batizocoi</i>	B bati
	Wi 1302-2	<i>A. cruziana</i>	B bati
	Wi 1291	<i>A. krapovickasii</i>	B bati
	K 30006	<i>A. hoehnei</i>	B hoeh
	V9094	<i>A. hoehnei</i>	B hoeh
	V 9923	<i>A. schininii</i>	A
	V 10309	<i>A. stenosperma</i>	A
	V 14309	<i>A. villosa</i>	A
	Vp 5000	<i>A. diogoi</i>	A
	V14167	<i>A. duranensis</i>	A
	V 13738	<i>A. glandulifera</i>	D
Ano 2007/2008	K 30076	<i>A. ipaënsis</i>	B ipae
	V 13985	<i>A. hoehnei</i>	B hoeh
	K 35005	<i>A. benensis</i>	B bene
	V 7635	<i>A. vallsii</i>	B vall
	V 12549	<i>A. hypogaea "tipo Xingu"</i>	2n=40
	Mf 1678	<i>A. hypogaea var. aequatoriana</i>	2n=40
	cv Tatu	<i>A. hypogaea var. fastigiata</i>	2n=40
	Mf 1538	<i>A. hypogaea var. hirsuta</i>	2n=40
	V 12548	<i>A. hypogaea var. hypogaea</i>	2n=40
	Mf 1560	<i>A. hypogaea var. peruviana</i>	2n=40
	cv Tatuí	<i>A. hypogaea var. vulgaris</i>	2n=40
	Sj 2775	<i>A. monticola</i>	2n=40
	V 14165	<i>A. monticola</i>	2n=40
	V 13023	<i>A. palustris</i>	2n=18
	Vp 5000	<i>A. diogoi</i>	A
	V 14167	<i>A. duranensis</i>	A
	V 6325	<i>A. helodes</i>	A
	V 13779	<i>A. kuhlmannii</i>	A
	V 13250	<i>A. kempff-mercadoi</i>	A
	V 14042	<i>A. microsperma</i>	A
	V 9923	<i>A. schininii</i>	A
	V 13728	<i>A. simpsonii</i>	A
	V 10309	<i>A. stenosperma</i>	A
	V7677	<i>A. paraguariensis</i>	EREC

5.3.1- TÉCNICA DE CRUZAMENTOS

Os cruzamentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação.

A técnica de polinização em amendoim consiste na emasculação das flores dos genitores femininos ainda na fase de botão, entre 16 e 19 horas. Durante a emasculação, as peças da corola são cuidadosamente afastadas até a exposição dos estames, que são retirados com o auxílio de uma pinça. Logo a seguir, as peças são recolocadas na posição original. Na manhã do dia seguinte à emasculação, procede-se à polinização das flores emasculadas, entre 7 e 10 horas, utilizando-se os grãos de pólen dos genitores masculinos selecionados.

Os grãos de pólen coletados no momento da polinização são transferidos do genitor masculino para o estigma do genitor feminino com o auxílio de uma pinça. A pinça utilizada para a polinização foi mergulhada e agitada em álcool e, depois seca com o auxílio de um papel toalha, para que eventuais grãos de pólen de um cruzamento não contaminem o cruzamento seguinte.

Para maior sucesso da polinização, foi utilizado um borrifador manual, para aspergir água sobre os estigmas, antes de proceder à polinização. Desta maneira, é possível maior aderência dos grãos de pólen, ou mesmo de toda a antera, sobre os estigmas e, também, a manutenção destas estruturas no local desejado. Mesmo passados alguns dias após a polinização, ainda é possível visualizar a presença da parte masculina transportadas artificialmente durante a polinização controlada.

As flores polinizadas artificialmente foram identificação com um cordão azul e etiqueta contendo a data da polinização e estas foram mantidas presas à planta mãe com o auxílio de uma mini presilha de cabelo (“piranhazinha”). Com a confirmação do sucesso da polinização, o cordão azul foi trocado por um de cor laranja, mantendo-se a etiqueta da data de polinização, facilitando deste modo a visualização dos cruzamentos bem sucedidos e de seus respectivos “pegs”.

Para cada cruzamento foi calculada a porcentagem de sucesso da hibridação, dividindo o número de híbridos produzidos pelo número de

polinizações realizadas e, multiplicando o resultado por 100, como mostrado pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ de sucesso} = (\text{número de híbridos} / \text{número de polinizações}) \times 100$$

Os “pegs” obtidos foram monitorados diariamente, até que a planta mãe terminasse seu ciclo e/ou os pegs se desprendessem da planta-mãe. As sementes que germinaram nos vasos tiveram suas plântulas, cuidadosamente retiradas da floreira e transplantadas para copos plásticos até seu melhor desenvolvimento. Os frutos colhidos foram colocados para germinar para se obter a geração F₁ dos híbridos, usando a mesma técnica descrita anteriormente, porém sem a necessidade de colocar uma solução estimuladora da quebra de dormência.

5.4- ANÁLISE DA VIABILIDADE DO GRÃO-DE-PÓLEN POR COLORAÇÃO E GERMINAÇÃO

A análise da viabilidade do grão-de-pólen por coloração foi iniciada pela coleta, ao acaso, de oito flores por tipo de cruzamento diferente. Fez-se a maceração das anteras em uma lâmina e coloração dos grãos-de-pólen com carmim acético 2% com glicerina e cobertura da lâmina com uma lamínula. A contagem ocorreu a partir de trinta minutos após a coloração. De cada flor, foram contadas cinco repetições de 100 grãos-de-pólen, totalizando 500 grãos-de-pólen por flor.

Calculou-se a média dos grãos-de-pólen corados por flor, expressando-se o resultado em porcentagem de viabilidade estimada.

A germinação do grão-de-pólen é uma técnica direta de identificação da viabilidade do grão-de-pólen. O protocolo, desenvolvido segundo Niles &

Quesenberry, (1992), com pequenas modificações, consistiu no preparo de uma solução básica para meio 11 (10 mg de H_3BO_3 , 30 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml KNO_3 , completar para 100 ml de água), com posterior adição de 1,5 g de sacarose a cada 10 ml de solução básica no momento de preparo das lâminas.

Sobre uma lâmina, colocou-se uma gota da solução e adicionaram-se os grãos-de-pólen. As lâminas com os grãos-de-pólen ficaram acondicionadas em uma câmara úmida por até 2 horas. Após esse período, colocou-se uma lamínula sobre a solução e foi contado, ao microscópio, o número de tubos polínicos com tamanho maior que o próprio grão-de-pólen, em relação ao número total de grãos-de-pólen observados na lâmina, expressando-se o resultado em percentagem.

5.5- RESGATE DE EMBRIÕES DOS HÍBRIDOS

Devido à necessidade de manter certos híbridos no cultivo *in vitro*, alguns materiais foram submetidos à técnica de resgate de embriões. O procedimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Hortaliças (CNPH) localizado em Brasília.

Para a desinfecção das sementes e plântulas foi preparada uma solução de hipoclorito de sódio 0,4%. Para cada 100 ml de solução foi utilizado 20 ml de hipoclorito de sódio e três gotas de Twenn 20 e o pH ajustado em 7,0.

As sementes foram envolvidas em gaze e inseridas em tubos de ensaio, identificados com o acesso correspondente e, mergulhadas na solução de hipoclorito de sódio durante 15 minutos. Após esse período o material foi lavado por três (03) vezes com água destilada.

No interior da câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças e bisturi, as sementes foram retiradas dos frutos e, a seguir, os embriões retirados do interior dos cotilédones foram alocados num tubo de ensaio, previamente preparado com meio de BA 0,25. Os tubos de ensaios, com o material inoculado, estão sendo

mantidos em sala ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz e 08 horas de escuro, com temperatura entre 25-27°C.

5.6- ANÁLISE MOLECULAR

O grau de diversidade entre os distintos acessos disponíveis de cada espécie em cruzamento foi estimado por meio de marcadores microssatélites. Foram analisados 96 acessos pertencentes ao gênero *Arachis*, assinalados na tabela 1, através de 30 iniciadores SSRs (Simple Sequence Repeats), desenvolvidos para *A. hypogaea*, marcados com diferentes fluorescências.

O DNA genômico total foi extraído de folíolos jovens, seguindo o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), com pequenas adaptações. Para a extração os microtubos de 2 ml com fundo cônico foram identificados de acordo com o acesso e, em cada um deles foi colocada uma conta de cerâmica (“bead”) cilíndrica, as folhas frescas, aproximadamente, um ou dois folíolos e outra conta de cerâmica redonda. Nesta fase, caso necessário, os tubos com o material coletado, podem ser armazenados em freezer –20°C para posterior análise.

Em cada um dos microtubos foi adicionado 800µl de tampão CTAB 2x + mercaptoetanol 1%. O tubo com o tampão foi mantido aquecido dentro de um vasilhame com água a 65°C. As amostras foram trituradas por 2 ou 4x de 20", em triturador FAST PREP™ FP120/BIO 101 Savant. As amostras trituradas foram mantidas em banho-maria por, aproximadamente, 30-60' a 65°C. A cada 10' os microtubos foram invertidos, para que o tampão agisse sobre toda a amostra triturada. Após este período as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente.

Em cada um dos microtubos foram adicionados 600 µl de CIA (clorofórmio-álcoolisoamílico 24:1). As amostras foram suavemente invertidas como descrito na etapa anterior, por aproximadamente, 20 vezes ou durante 5 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 10' a 11,000 RPM.

De cada uma das amostras foram retiradas 3 alíquotas de 180 µl do sobrenadante e transferidas para o outro microtubo de 1,5ml correspondente da amostra que foi identificado na primeira etapa. Ter o cuidado de, ao pipetar o sobrenadante, não puxar os demais componentes que foram separados durante a centrifugação. Em cada um desses microtubos foram adicionados 500 µl de isopropanol e as amostras foram invertidas suavemente para que ocorresse a formação do “pellet” de DNA. Durante essa etapa o tubo de isopropanol deve ser mantido em uma vasilha com gelo.

Deixar as amostras por no mínimo 30' no freezer a -20°C. Centrifugar novamente o material por 15' a 11,000 RPM e, descartar o sobrenadante tomando o cuidado de manter o pellet de DNA do interior dos microtubos. O pellet de DNA foi lavado por duas vezes com 600 µl de etanol 70%. O etanol foi descartado e os microtubos com o pellet de DNA ficaram secando overnight. Os microtubos ficaram na posição horizontal para que não ocorresse a perda do pellet.

No dia seguinte, foram adicionados em cada um dos microtubos 100 µl de TE/RNAase para eluição dos pellets. Os microtubos foram mantidos overnight na geladeira, de modo que ocorresse a digestão das RNases. No dia seguinte os microtubos foram agitados para proceder a quantificação.

A quantificação do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração utilizando o aparelho de eletroforese Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus Life Technologies TM Horizon [®]58 ligado numa voltagem de aproximadamente 69 miliampéres durante 20 minutos. A visualização do gel foi realizada pelo Eagle Eyes, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda.

As reações de PCR foram preparadas num volume final de 6 µl, sendo 4 µl do mix e 2 µl do DNA (tabela 4).

Tabela 4: Quantidade dos reagentes utilizados para a realização das PCRs

Reagentes	Quantidades
H ₂ O	1,0 µl
BSA (2,5mg/ml)	1,2 µl
Tampão (com Mg)	0,5 µl
dNTP (2,5 mM)	1,0 µl
Primer (10 µM)	0,1 µl
Taq (5 u/µl)	0,2 µl
DNA	2,0 µl

O programa de amplificação (tabela 5) foi realizado em termociclador. Dependendo do primer utilizado a temperatura do programa de amplificação foi adaptada.

Tabela 5: Temperaturas utilizadas durante a amplificação das reações de PCR.

Temperatura	Tempo
94°	5'
94°	1'
58°*	1'
72°	1'
72°	1'

*temperatura variável de acordo com o primer

} 30x

A detecção alélica foi realizada em seqüenciador automático de DNA ABI377 em sistema de locos multiplex.

Foram utilizados 12 sistemas multiplex, montados pelo programa MULTIPLEXER 4.0, desenvolvido pelo Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, da

Universidade Federal de Goiás. Cada multiplex foi composto por dois (duplex), três (triplex) ou quatro (tetraplex) marcadores, de acordo com a fluorescência, número de pares de bases dos alelos e a temperatura de anelamento (tabela 6).

O padrão de bandas nos géis de eletroforese foi analisado pelo programas GeneScan e Genotyper. A distância genética entre cada par de acessos foi calculada a partir do comprimento dos alelos em pares de base de cada acesso, utilizando o coeficiente de Rogers modificado por Wright (1978) e o programa “bood”, desenvolvido pelo Dr Alexandre Coelho, da Universidade Federal de Goiás. A matriz de distância resultante foi submetida a análise de agrupamento usando UPGMA (“unweighted pair-group method analysis”). A consistência dos agrupamentos obtidos a partir dos dados de distância genética foi comparado com a matriz cofenética, gerada pelo programa MXCOMP, usando o programa NTSYS, versão 2.1 (Rohlf, 2000).

Para cada um dos 30 marcadores analisados, em 96 amostras, foi estimado o número médio de alelos e de genótipos por loco, a heterozigosidade observada (H_0) e esperada (H_e) e o polimorfismo usando o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), utilizando o programa PowerMarker V 3.25 (Liu & Muse, 2005).

Tabela 6: Sistemas multiplex, primers marcados e suas respectivas fluorescências, tamanho em pares de base, temperatura de amplificação e os produtos que foram amplificados e analisados.

Multiplex	Primer	Fluorescência	Tamanho (pb)	Temperatura (°C)	Analisado
1	TC3E02	Azul	270-310	58	x
	AC2H11	Verde	230-270	58	x
	TC7G10	Azul	110-142	58	x
2	TC7H11	Azul	340-360	58	x
	RN2C06	Verde	190-220	58	x
	TC6E01	Azul	154-186	58	x
3	TC7A02	Azul	308-320	58	x
	GI-338	Verde	240-270	58	x
	TC4F12	Azul	220-232	58	x
	GI-832	Verde	200-210	56	x
4	TC11A02	Verde	284-292	58	x
	TC6H03	Azul	210-228	58	x
	RN22G07	Verde	180-210	58	x
5	TC9F10	Verde	286-320	56	x
	TC1D02	Azul	242-278	56	x
	GI-342	Verde	210-240	58	x
6	RNO-681	Verde	310-350	54	x
	TC7E04	Azul	290-300	56	
	TC9F04	Verde	122-142	54	
7	AC2B03	Verde	296-308	54	x
	TC2B09	Azul	190-200	52	x
	RI1F06	Verde	312-372	56	x
8	GI-1107	Verde	360-384	52	x
	TC1A02	Azul	240-276	54	x
9	TC3H02	Azul	280-300	54	x
	TC11A04	Verde	172-204	52	x
	TC6G09	Azul	132-146	50	x
10	TC2A02	Azul	194-212	48	x
	RNO-615	Verde	390-400	56	
11	TC1E01	Azul	154-248	48	x
	TC9C12	Verde	256-300	54	
	TC7C06	Azul	148-176	52	x
	TC11H06	Verde	190-214	52	x
12	TC1A01	Azul	202-222	54	x
	TC2D06	Azul	196-224	48	
	TC3E05	Azul	358-370	48	
	RN8C09	Verde	260-290	56	

5.7- ANÁLISE CITOGENÉTICA

5.7.1- ANÁLISE MITÓTICA

Após a germinação das sementes, as raízes novas e pequenas, com até 1,5 cm, foram tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M, durante 2 a 3 horas a 20°C, e fixadas em solução de Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v), à temperatura ambiente, por 24 horas. Após a fixação das pontas de raízes, estas passaram por hidrólise em HCl 1N por 10 minutos, a 60°C, seguida, por três lavagens em água destilada. Para coloração, foi usada a técnica de Feulgen, utilizando a solução corante denominada de reativo de Schiff, por cerca de uma hora, à temperatura ambiente. As pontas das raízes foram colocadas sobre uma lâmina com uma gota de carmim acético 2% e cobertas com lamínula, que a seguir receberam uma leve pressão (Guerra, 2002).

As células que apresentaram os cromossomos metafásicos foram fotografadas digitalmente com microscópio Axiophot.

5.7.2- ANÁLISE DE ACESSOS COM HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA – FISH

A análise citogenética por FISH apresenta os mesmos passos iniciais descritos para a análise mitótica, desde a coleta até a fixação do material. Os materiais fixados podem ser mantidos a - 20°C até a análise.

O material fixado foi lavado duas vezes em água destilada e a seguir digeridos numa solução de pectinase + celulase 2%, por 30 a 40 minutos, a 37°C. Após a retirada da enzima, o material foi coberto com água destilada. As pontas dos meristemas devem estar destacadas ou facilmente destacáveis do restante da

raiz. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, os meristemas foram sugados e transferidos para uma lâmina de vidro que tenha sido previamente limpa, de modo que não fique, sobre esta, nenhum resquício de poeira ou qualquer outro tipo de material. O excesso de água foi retirado.

Sobre o meristema colocou-se uma gota de ácido acético e com o auxílio de uma agulha fina as células foram suavemente separadas. Esta etapa foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio. O material foi, então, coberto com uma lamínula e visualizado no microscópio. As lâminas que apresentam mais de sete metáfases foram selecionadas tendo suas lamínulas retiradas com gás dióxido de carbono. As lâminas foram secas em estufa a 37°C podendo, após esta etapa, ser armazenadas a -20°C.

As lâminas foram aquecidas em chapa a 59°C, por 10 minutos, para que o material fosse fixado e, a seguir esfriadas em temperatura ambiente. Sobre cada lâmina foi colocado 100µL da solução de trabalho (900µL de solução de citrato de sódio salino 2x (SSC 2x) e 9 µL de RNase), cobertas com papel parafilm e mantidas em câmara úmida escura por a 37°C por 1h. As lâminas foram lavadas numa solução de citrato de sódio salino 2x (SSC 2x) por três vezes de 5 minutos cada.

Foi preparada uma solução base para proteinase K com 2ml de TRIS + 2ml de Cl_2Mg + 96ml de água destilada, distribuídas em duas cubas de vidro, com 50ml cada e mantidas aquecidas a 37°C por 1h. Em uma das cubas foram adicionados 10µL de proteinase K, na hora em que as lâminas foram lavadas nessa solução.

As lâminas foram colocadas na cuba de vidro que não contivesse a proteinase K por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram transferidas para a cuba de vidro com proteinase K, por 10 minutos.

Foram preparados então três soluções tampão:

- 1- PBS 1x (5ml de PBS 10x + 45ml de água destilada)
- 2- PBS + cloreto de magnésio (5ml de PBS 10x + 42,5ml de água destilada + 2,5ml de $\text{Cl}_2 \text{Mg}$)

3- PBS + formaldeído (5ml de PBS 10x + 43,75ml de água destilada + 1,25 μ L). O formaldeído foi adicionado apenas na hora do uso do tampão.

As lâminas foram lavadas na solução tampão 1 por 5 minutos; na solução tampão 2 por 5 minutos; na solução tampão 3 por 10 minutos e, novamente, na solução tampão 1 por 5 minutos.

As lâminas foram desidratadas em solução de álcool etílico com concentrações crescentes de 70%, 96% e 100%, permanecendo 2 minutos em cada concentração e, a seguir, secaram a temperatura ambiente.

O mix de hibridização com DNA foi preparado com esperma de salmão + formamida 60% + dibissulfato + SSC 2x + sondas.

Mix 1= 18+26S +DNA Biotina 4 μ L

Mix 2= 5S + DNA Digoxigenina 4 μ L

O mix foi desnaturado em termociclador a 75°C por 10 minutos e mantido a 4°C por 5 minutos.

As lâminas foram aquecidas na chapa a 59°C por 1 ou 2 minutos. Sobre cada lâmina colocou-se 4,5 μ L do mix, cobrindo o material com uma lamínula. As lamínulas foram seladas com cola translúcida para pneumáticos e colocadas na chapa quente a 74°C por 10 minutos. As lâminas foram transferidas para a câmara úmida escura e incubadas durante a noite a 37°C para que ocorresse a hibridização.

No dia seguinte, a cola foi retirada. Para que as lamínulas caiam, as lâminas foram ser mergulhadas numa solução de citrato de sódio salino 2x (SSC 2x). A seguir as lâminas foram passadas para uma cuba de vidro com formamida mantida aquecida a 37°C, por 15 minutos e, depois, lavadas em SSC 2x por 15 minutos. Retirou-se o excesso de solução de citrato de sódio salino e, sobre cada, lâmina adicionou-se 100 μ L da solução bloqueadora de BSA 3%.

Numa sala escura foram preparadas as soluções de anticorpos:

Anticorpo 1= 4 μ L anti DIG (mouse) + 4 μ L anti BIO (goat) + 135 μ L de BSA

Anticorpo 2= 4 μ L FITC (mouse) + 2,5 μ L TRICT (goat) + 135 μ L de BSA

Adicionou-se 15 μ L do anticorpo 1 sobre a lâmina, cobrindo-a com parafilm e incubada em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após 1 hora as lâminas foram

lavadas por 3 vezes em solução de BSA 0,1% por 2 minutos cada. Adicionou-se 15µL do anticorpo 2 sobre a lâmina, cobriu-se com parafilm e incubou-se em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após 1 hora as lâminas foram lavadas por 3 vezes em solução de BSA 0,1% por 2 minutos cada.

As lâminas foram lavadas em formaldeído por 5 minutos. As lâminas foram desidratadas em solução de álcool etílico com concentrações crescentes de 70%, 96% e 100%, permanecendo 2 minutos em cada concentração e, a seguir, secaram a temperatura ambiente por, aproximadamente, 2 horas.

Após essas etapas procedeu-se a hibridização com 4,5µL de DAPI sobre cada lâmina, cobrindo-a com a lamínula, fazendo uma leve compressão da lâmina entre duas folhas de papel toalha para que o excesso de DAPI fosse retirado. As lamínulas foram seladas com cola translúcida para pneumáticos. Aguardou-se até que a cola estivesse seca para armazenar em geladeira até o dia seguinte quando se fez a análise e fotografia das lâminas em microscópio Leica DMRX epifluorescente equipado com sistema de câmera digital Leica DC 500. As imagens foram capturadas em vermelho, verde e azul usando filtros para TRICT, FITC e DAPI. As imagens digitais foram montadas usando o software IM 1000 Leica e então importadas para o Photoshop, versão 7.0 (Adobe) para processamento final.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- ANÁLISE DA VIABILIDADE DO GRÃO-DE-PÓLEN DOS GENITORES POR COLORAÇÃO E GERMINAÇÃO

Todos os genitores usados no processo de hibridização foram analisados quanto à viabilidade do grão-de-pólen. Os resultados das análises da viabilidade do grão de pólen por coloração e germinação estão expressas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

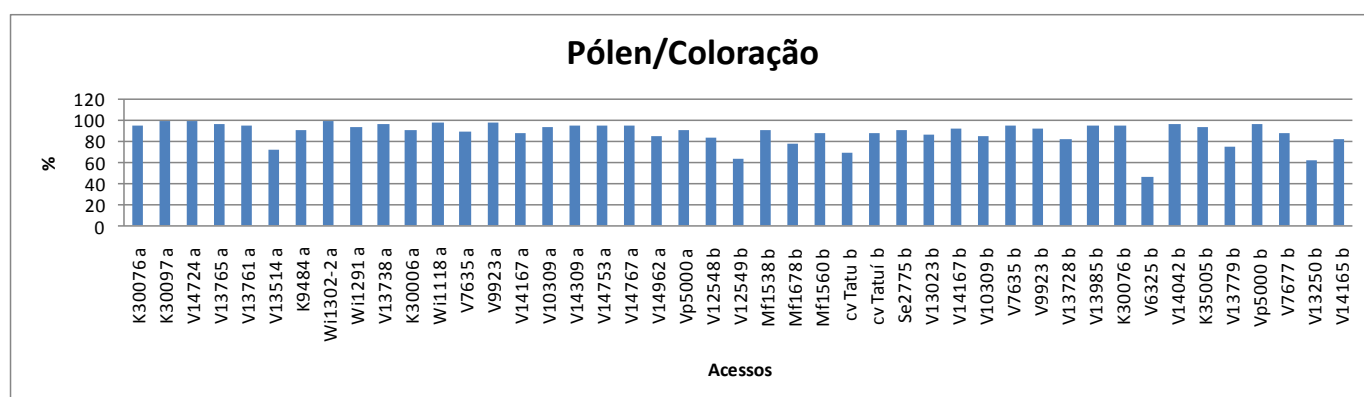


Figura 6: Porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen de acessos silvestres de *Arachis* pelo método indireto de coloração analisados durante o ano 2006/2007 (a) e 2007/2008 (b).

Os resultados de coloração mostraram valores percentuais compreendidos entre 46,75% para *A. helodes* V 6325 e 99,17% para *A. magna* K 30097. Todos os demais acessos apresentaram valores superiores a 61,92%, apresentado por *A. kempff-mercadoi* V 13250, sendo o valor médio de pólen corado de 87,78%.

As primeiras flores de *A. helodes* V 6325, apresentaram muitos grãos de pólen mal formados e, conseqüentemente, não foram corados. Passadas algumas semanas, os grãos de pólen produzidos, na sua maioria, já apresentavam melhor formação, melhorando estatisticamente a relação entre grão de pólen bem e mal

formado. Aparentemente, o acesso mostrou ser afetado pelas condições ambientais em todo o período de hibridização, ou seja, em dias nublados ou frios, o número de flores usadas para a polinização era maior do que em dias ensolarados e quentes. Nesses dias, o pólen dificilmente se destacava das anteras, sendo necessário, na maioria das vezes, depositarmos toda uma antera sobre o estigma da genitora para proceder à polinização.

Os resultados de germinação mostraram valores percentuais variando entre 41,70% para *A. helodes* V 6325 e 88,00% para *A. diogoi* Vp 5000. Os demais acessos apresentaram valores superiores a 41,92%, apresentado por *A. kempff-mercadoi* V 13250, sendo o valor médio de pólen corado de 75,33%.

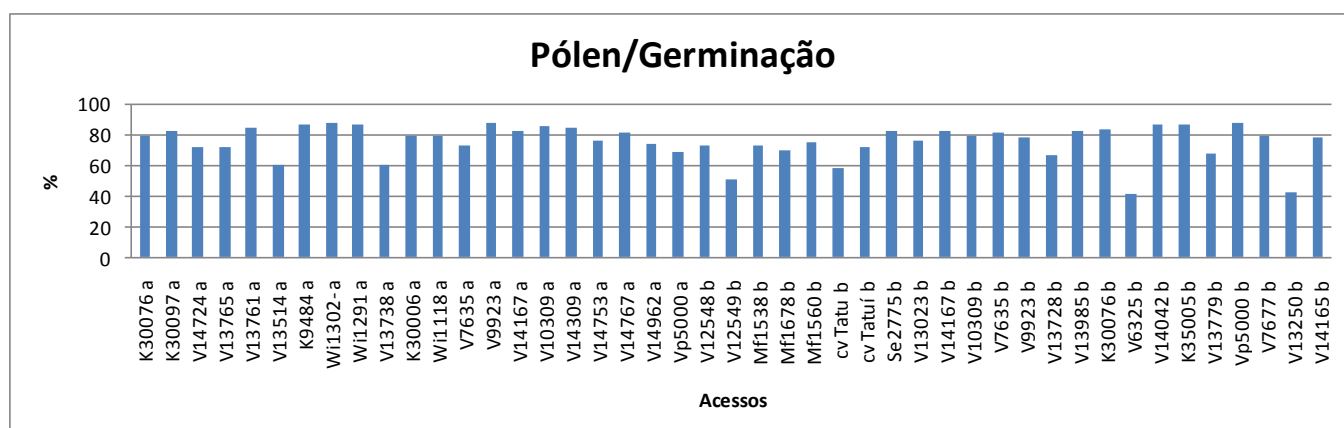


Figura 7: Porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen de acessos silvestres de *Arachis* pelo método direto de germinação analisados durante o ano 2006/2007 (a) e 2007/2008 (b).

Para Stanley e Linskens (1974) nenhum método de viabilidade é completamente satisfatório, pois os testes químicos usam corantes que reagem com os constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade do grão de pólen germinar. Apesar dessa condição, a estimativa da viabilidade do pólen é importante para assegurar que os materiais envolvidos no processo de cruzamento apresentem, teoricamente, a capacidade de desencadear

o complexo processo reprodutivo, que envolve aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos.

Segundo Einhardt et al. (2006), que comparou métodos para testar a viabilidade de pólen em pessegueiro, para assegurar o sucesso de hibridizações controladas é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade, com valores superiores a 30%. Apesar de esse estudo ter sido realizado com uma fruteira, a viabilidade do pólen encontrada nas espécies silvestres de *Arachis*, apresentou porcentagem superior ao valor mínimo esperado para a ocorrência de fecundação.

Os trabalhos que tratam dos aspectos reprodutivos das espécies de *Arachis* são relativos, em sua maioria, a *A. hypogaea* ou àquelas espécies que estão envolvidas com sua origem.

Com o auxílio da microscopia eletrônica Pen et al., (1987) identificou a presença de três grupos taxonômicos de pólen em *A. hypogaea*.

Trabalhando com as espécies tetraplóides *A. hypogaea*, *A. monticola* e *A. glabrata*, Raman (1965) relatou que estas apresentavam, em média, os maiores grãos de pólen e que não houve diferenças significativas no tamanho de pólen entre as espécies diplóides.

Em um estudo específico sobre a morfologia e a germinação do pólen entre espécies de *Arachis*, Chabdran & Pandya (2003) procuraram encontrar uma relação entre as espécies silvestres e a cultivada *A. hypogaea*, porém não foi possível estabelecer clara distinção entre as espécies, quanto à morfologia do pólen. Esses autores também relataram que a taxa de crescimento do tubo polínico mostrou-se muito variável entre as espécies e genótipos, podendo isso ser um indicativo de incompatibilidade entre eles.

Apesar de poucos resultados conclusivos na literatura, quanto ao comportamento reprodutivo das espécies silvestres de *Arachis*, o uso das estimativas de viabilidade de pólen constitui uma ferramenta importante para mensurar a qualidade dos materiais envolvidos nos cruzamentos.

Comparando-se as técnicas de coloração e germinação, a diferença de valores de 10 a 20% entre elas é considerada comum e, devem-se mais a

diferença de superestimação no método indireto (coloração) e de subestimação no método direto (germinação), dos grãos de pólen viáveis (Galetta, 1983).

Mesmo alguns acessos tendo apresentado valores baixos em alguns períodos dos cruzamentos, todos os demais mostraram alta viabilidade dos grãos de pólen, o que significa que os acessos utilizados como genitor paterno estavam aptos para fecundar as flores dos acessos utilizados como genitor feminino.

6.2- HIBRIDAÇÃO

A primeira estação de cruzamentos teve início em outubro de 2006 com a germinação dos genitores. Foram obtidas 22 plantas do genitor feminino *A. gregoryi*, acesso V 14957, e 22 diferentes genitores masculinos *A. batizocoi* K 9484; *A. cruziana* Wi 1302-2; *A. diogoi* Vp 5000; *A. duranensis* V 14167; *A. gregoryi* V 14753, V 14767 e V 14962; *A. glandulifera* V 13738; *A. hoehnei* K 30006; V 9094; *A. ipaënsis* K 30076; *A. krapovickasii* Wi 1291; *A. magna* V 13761; V 13765; V 14724; K 30097; *A. schininii* V 9923; *A. stenosperma* V 10309; *A. valida* V 13514; *A. vallsii* V 7635; *A. villosa* V 14309; *A. williamsii* Wi 1118. O término do período reprodutivo foi em maio de 2007 (Figura 8 A e B).

A segunda estação iniciou em setembro de 2007, com a germinação dos genitores. Foram utilizadas 24 plantas do genitor feminino *A. gregoryi*, acesso V 14957, e 24 diferentes genitores masculinos *A. benensis* K 35005; *A. diogoi* Vp 5000; *A. duranensis* V 14167; *A. helodes* V 6325; *A. hoehnei* V 13985; *A. kuhlmannii* V 13779; *A. ipaënsis* K 30076; *A. kempff-mercadoi* V 13250; *A. hypogaea* "tipo Xingu" V 12549; *A. hypogaea* var. *aequatoriana* Mf 1678; *A. hypogaea* var. *fastigiata* cv Tatu; *A. hypogaea* var. *hirsuta* Mf 1538; *A. hypogaea* var. *hypogaea* V 12548; *A. hypogaea* var. *peruviana* Mf 1560; *A. hypogaea* var. *vulgaris* cv Tatuí; *A. monticola* Sj 2775 e V 14165; *A. microsperma* V 14042; *A. palustris* V 13023; *A. schininii* V 9923; *A. simpsonii* V 13728; *A. stenosperma* V

10309; *A. vallsii* V 7635 além de *A. paraguariensis* V 7677, esta última espécie da secção *Erectoides*. O término do período reprodutivo ocorreu em abril de 2008.

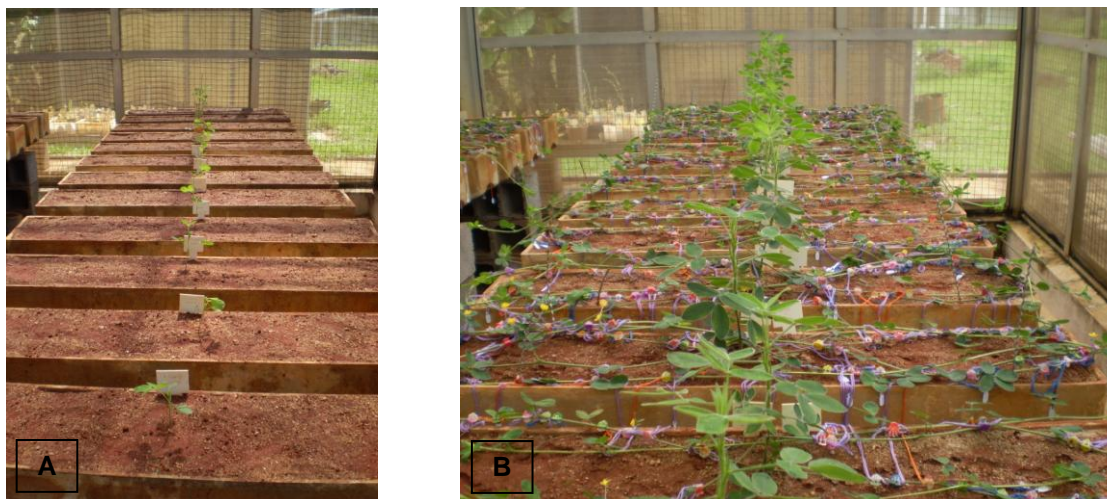


Figura 8: A) Floreiras com a genitora *Arachis gregoryi* V 14957 no início da estação de hibridação. B) Floreiras com a genitora *Arachis gregoryi* V 14957 dois meses após o início da estação de hibridação.

Em ambos os períodos reprodutivos, os genitores masculinos estiveram presentes em duplicata (Figura 9 A e B). Porém, apenas uma das plantas foi usada como doador de pólen. A existência de uma segunda planta no vaso serviu como um “back-up”, caso algum problema de praga e/ou a falta de flores ocorresse na planta escolhida como doadora. Houve o cuidado de sempre colher flores apenas do primeiro doador. Em nenhuma linha de cruzamento foi necessário usar o segundo doador para a conclusão dos cruzamentos.



Figura 9: A) Floreiras com os genitores masculinos no início da estação de hibridação. B) Floreiras com os genitores masculinos dois meses após o início da estação de hibridação.

Essencialmente, no primeiro ano de cruzamento foram feitas hibridações com acessos de diferentes espécies, mas associados ao mesmo genoma provável de *A. gregoryi* (B). Também foi incluído o representante do genoma D, *A. glandulifera* V 13738 e quatro acessos associados ao genoma A. Alguns desses acessos foram repetidos no segundo ano de cruzamentos, devido a problemas com um dos genitores. Às vezes, não houve bom desenvolvimento do genitor feminino, como nos cruzamentos com *A. diogoi* Vp 5000, *A. stenosperma* V 10309 e *A. vallsii* V 7635, ou devido à baixa produção de frutos, provavelmente híbridos, como ocorreu nos cruzamentos com *A. schininii* V 9923 e *A. ipaënsis* K 30076.

No segundo ano foram cruzados com *A. gregoryi* os representantes das seis variedades botânicas de *A. hypogaea*, mais o do tipo Xingu, dois acessos de *A. monticola*, que apresenta $2n=4x=40$ cromossomos, nove representantes do genoma A; quatro acessos associados ao genoma B, um acesso com $2n=2x=18$ cromossomos e um representante da secção *Erectoides*.

Foram feitas 1368 polinizações no primeiro ano – 2006/2007 - 1799 no segundo ano – 2007/2008 - totalizando 3167 polinizações realizadas (Figura 10).



Figura 10: Flor da genitora *Arachis gregoryi* V 14957 emasculada e polinizada artificialmente.

O percentual de polinizações em cada cruzamento foi muito variável de acordo com o número e a qualidade das flores que os genitores femininos e masculinos apresentavam (Figuras 11 e 12). No primeiro ano do programa, não foi possível fazer cruzamentos entre *A. gregoryi* V 14957 x *A. hoehnei* V 9094, pois não houve sincronia de florescimento entre os genitores. Já com o outro acesso de *A. hoehnei*, K 30006, foi realizado o maior número de polinizações 155. No segundo ano os cruzamentos que tiveram menor e maior número de polinizações foram respectivamente *A. gregoryi* V 14957 x *A. ipaënsis* K 30076 com quatro e *A. gregoryi* V 14957 x *A. stenosperma* V 10309, com 135 polinizações.

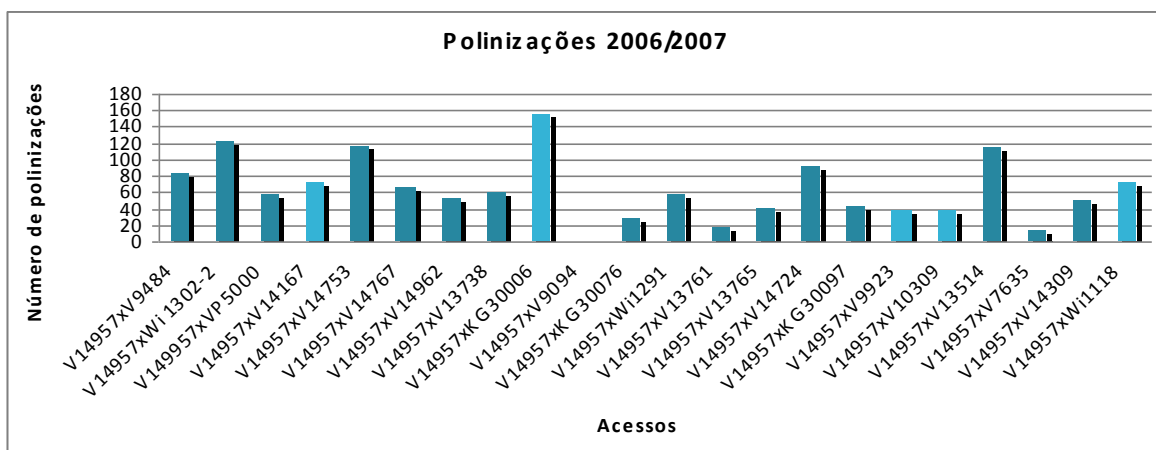


Figura 11: Número de polinizações realizadas entre os acessos durante o primeiro ano de cruzamentos nos anos 2006/2007

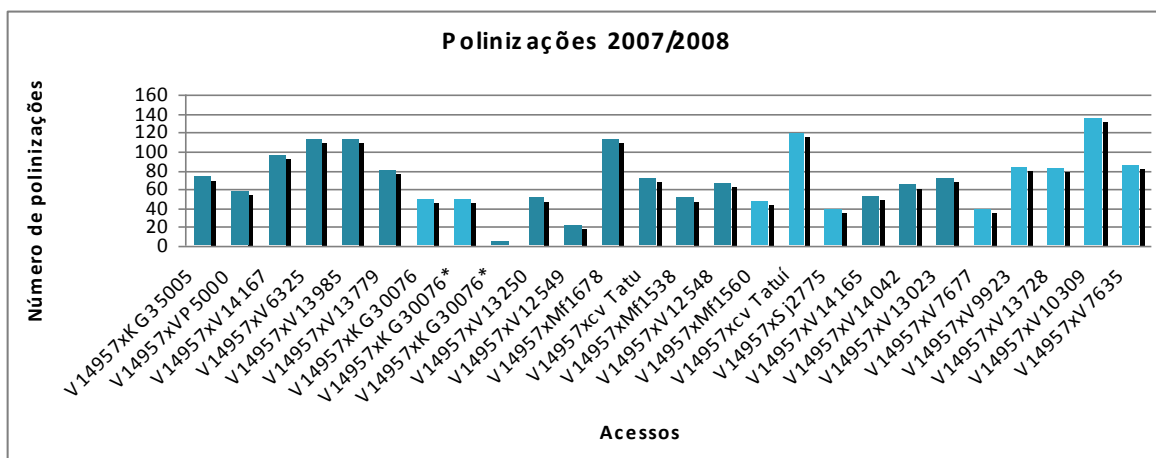


Figura 12: Número de polinizações realizadas entre os acessos durante o segundo ano de cruzamentos 2007/2008.*Cruzamento duplicado

O controle da polinização foi realizado com a identificação da flor polinizada com uma linha azul, à qual estava presa uma etiqueta da data de realização do cruzamento (Figura 13).



Figura 13: Flores da genitora *Arachis gregoryi* V 14957 polinizadas artificialmente, etiquetadas e marcadas com um cordão.

Após, aproximadamente, duas semanas era possível saber se houve ou não sucesso da hibridação, pela ocorrência da formação do “peg”. A certeza da polinização pode ser confirmada pelo surgimento do “peg” saindo justamente nas flores previamente marcadas com o cordão azul (Figura 14).

Em caso positivo, o cordão azul era trocado por outro de cor dourada, mantendo a etiqueta da data. Desta maneira ficava fácil à localização dos “pegs”, sua quantificação e, também, o cuidado especial com esta região (Figura 15).

As 3167 polinizações resultaram na produção de 862 plantas e 153 híbridos confirmados. A grande diferença entre o número de plantas produzidas e o número de híbridos obtidos é justificada pelo grande número de indivíduos que morreram ainda na fase juvenil, não sendo possível confirmar se o material era ou não de origem híbrida. Portanto, o número de 153 híbridos reflete os materiais que sobreviveram e cujo caráter híbrido foi confirmado por marcadores morfológicos ou citogenéticos. A tabela 7 resume os resultados das hibridações realizadas durante as duas estações de cruzamentos.



Figura 14: Surgimento do “peg” na base da flor da genitora *Arachis gregoryi* V 14957 que foi polinizada artificialmente.



Figura 15: Marcação diferencial do “peg” da genitora *Arachis gregoryi* V 14957 polinizada artificialmente.

O genitor feminino *A. gregoryi* acesso V 14957 mostrou ser um material com ampla plasticidade, pois foi possível a polinização e a conseqüente formação de

frutos com todos os representantes com que foi cruzado, envolvendo genomas, ploidias e secções distintas. Tendo em vista a demonstração por Silva & Fávero, (2006) da possibilidade de poliploidização do híbrido diplóide entre *A. gregoryi* x *A. linearifolia* e do cruzamento do anfidiplóide resultante com *A. hypogaea*, estima-se que *A. gregoryi* possa ser utilizada como uma espécie-ponte muito eficiente para a introgressão de genes oriundos das espécies silvestres para o amendoim cultivado. Seguramente o acesso V 14957, procedente de área muito próxima daquele utilizado por Fávero (2004), tem grande potencial. As primeiras tentativas de cruzar *A. gregoryi* com outras espécies do gênero foram realizadas pelo Dr Charles E. Simpson/Texas A&M University (Simpson & Valls, 2006). Apesar dos acessos serem diferentes daqueles usados neste trabalho, os resultados de ambas as pesquisas confirmam o bom funcionamento da espécie para estudos de hibridação.

Tabela 7: Resultados dos cruzamentos intra e interespecíficos realizados entre espécies do gênero *Arachis*. Genitores masculinos e seu respectivo ano de cruzamento, genoma do genitor masculino, acessos dos genitores envolvidos, número total de polinizações realizadas (NPO), número de segmentos de frutos obtidos (NSF), número de híbridos confirmados (NH), porcentagem de sucesso por cruzamento, porcentagem de viabilidade do pólen dos híbridos (VPH).

Genitor Masculino	Genoma paterno	Cruzamentos V 14957 ♀ x ♂	NPO	NSF	NH	(NH x 100)/NPO	% (VPH)
<i>A. ipaënsis</i> ¹	B ipae	K 30076	28	10	0	0	-
<i>A. ipaënsis</i> ²	B ipae	K 30076	101	39	3	2,8	5,4
<i>A. gregoryi</i> ¹	B ipae	V 14753	116	24	2	1,7	43,6
<i>A. gregoryi</i> ¹	B ipae	V 14767	65	30	0	0	-
<i>A. gregoryi</i> ¹	B ipae	V 14962	51	6	0	0	-
<i>A. magna</i> ¹	B ipae	V 13761	16	0	0	0	-
<i>A. magna</i> ¹	B ipae	V 13765	40	8	0	0	-
<i>A. magna</i> ¹	B ipae	V 14724	90	4	2	2,2	10,45
<i>A. magna</i> ¹	B ipae	K 30097	42	11	4	9,5	7,12
<i>A. cruziana</i> ¹	B ipae	Wi 1302-2	121	36	3	2,5	5,22
<i>A. williamsii</i> ¹	B ipae	Wi 1118	70	28	10	14,3	2,6
<i>A. valida</i> ¹	B ipae	V 13514	114	36	11	9,6	5,45
<i>A. batizocoi</i> ¹	B bati	K 9484	82	61	1	1,2	nf
<i>A. krapovickasii</i> ¹	B bati	Wi 1291	57	19	2	3,5	0,4
<i>A. hoehnei</i> ¹	B hoeh	K 30006	155	59	1	0,6	12
<i>A. hoehnei</i> ¹	B hoeh	V 9094	0	0	0	0	-
<i>A. hoehnei</i> ²	B hoeh	V 13985	111	34	19	17,1	nf
<i>A. benensis</i> ²	B bene	K 35005	72	25	1	1,4	0,6
<i>A. vallsii</i> ¹	B vall	V 7635	11	0	0	0	-
<i>A. vallsii</i> ²	B vall	V 7635	84	22	10	11,90	nf
<i>A. glandulifera</i> ¹	D	V 13738	59	27	1	1,7	0,3
<i>A. hypogaea</i> “tipo Xingu” ²	AB	V 12549	20	3	0	0	-
<i>A. hypogaea</i> var. <i>aequatoriana</i> ²	AB	Mf 1678	111	46	4	3,6	nf
<i>A. hypogaea</i> var. <i>fastigiata</i> ²	AB	cv Tatu	70	31	1	1,4	nf
<i>A. hypogaea</i> var. <i>hirsuta</i> ²	AB	Mf 1538	50	13	1	2	nf
<i>A. hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i> ²	AB	V 12548	65	11	0	0	-
<i>A. hypogaea</i> var. <i>peruviana</i> ²	AB	Mf 1560	46	1	0	0	-
<i>A. hypogaea</i> var. <i>vulgaris</i> ²	AB	cv Tatuí	118	39	0	0	-
<i>A. monticola</i> ²	AB	Sj 2775	37	10	0	0	-
<i>A. monticola</i> ²	AB	V 14165	51	8	0	0	-
<i>A. palustris</i> ²	2n=18	V 13023	71	18	0	0	-
<i>A. diogo</i> ¹	A	Vp 5000	57	4	0	0	-
<i>A. diogo</i> ²	A	Vp 5000	56	20	3	5,4	nf
<i>A. duranensis</i> ¹	A	V 14167	71	0	0	0	-
<i>A. duranensis</i> ²	A	V 14167	94	32	1	1,1	nf
<i>A. helodes</i> ²	A	V 6325	112	22	3	2,7	nf
<i>A. kuhlmanni</i> ²	A	V 13779	79	24	12	15,18	4,8
<i>A. kempff-mercado</i> ²	A	V 13250	50	17	7	14	Nf
<i>A. microsperma</i> ²	A	V 14042	64	8	8	12,5	Nf
<i>A. schinini</i> ¹	A	V 9923	37	5	1	2,7	Nf
<i>A. schinini</i> ²	A	V 9923	83	14	11	13,3	Nf

Genitor Masculino	Genoma paterno	Cruzamentos V 14957♀ x ♂	NPO	NSF	NH	(NH x 100)/NPO	% (VPH)
<i>A. stenosperma</i> ¹	A	V 10309	37	0	0	0	-
<i>A. stenosperma</i> ²	A	V 10309	135	27	16	11,9	Nf
<i>A. simpsonii</i> ²	A	V 13728	81	18	2	2,5	Nf
<i>A. villosa</i> ¹	A	V 14309	49	4	4	8,2	Nf
<i>A. paraguariensis</i> ²	Erec	V 7677	38	8	0	0	-
			3167	862	153		

¹ primeiro ano de cruzamento 2006/2007.

² segundo ano de cruzamento 2007/2008.

nf= não houve florescimento.

Grupo 1 em vermelho (% de sucesso de 17,1 – 11,9)

Grupo 2 em verde (% de sucesso de 9,6 – 5,4)

Grupo 3 em azul (% de sucesso de 3,6 – 1,7)

Grupo 4 materiais que não se estabeleceram não sendo possível confirmar seu caráter híbrido

De acordo com os resultados dos cruzamentos intra e interespecíficos realizados entre as espécies do gênero *Arachis*, podem-se dividir os cruzamentos em quatro grupos grandes e não homogêneos.

O primeiro grupo engloba aqueles que apresentaram maiores porcentagens de sucesso. Estes cruzamentos foram *A. gregoryi* V 14957 x *A. hoehnei* V 13985 (17,1%), *A. kuhlmannii* V 13779 (15,18), *A. williamsii* Wi 1118 (14,3%), *A. kempff-mercadoi* V 13250 (14%), *A. schininii* V 9923 (13,3%), *A. microsperma* V 14042 (12,5%), *A. stenosperma* V 10309 (11,9%) e *A. vallsii* (11,90). Este grupo envolve espécies associadas aos genomas A e B.

Do cruzamento de *A. gregoryi* V 14957 com *A. kuhlmannii* V 13779 foram produzidos 24 segmentos de frutos e obtidas 12 plantas híbridas com estimativa de viabilidade de pólen de 4,8%.

Os híbridos com *A. williamsii* (Figura 16) apresentaram grande desenvolvimento vegetativo, chegando os ramos laterais a medirem mais de 2,5 metros. Possivelmente, esse desenvolvimento ocorreu em virtude dos híbridos não gastarem energia para a produção de frutos, pois, a média da viabilidade do pólen nesses materiais foi de 2,6%, não tendo sido evidenciado formação de “pegs” nas plantas. Esse material resultante de plantas do genoma B pode ser usado para a piramidização de gene em programas de melhoramento.



Figura 16: Híbridos de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis williamsii* Wi 1118 com ramos laterais superiores a 2,5m.

Outro material incluído nesse grupo é o híbrido com *A. hoehnei* V 13985. O material apresenta rápido crescimento, hábito ereto e intensa ramificação lateral (Figura 17). As plantas ainda não produziram flores e, portanto, não se pode estimar a viabilidade do pólen. Atualmente, são conhecidos sete acessos de *A. hoehnei*, todos do Estado do Mato Grosso do Sul. Porém, acredita-se não haver uniformidade entre esses materiais, devido a diferenças de comportamento entre os acessos no ciclo reprodutivo, em cruzamentos e, possivelmente, quanto à presença ou ausência do par de cromossomos A nesses acessos (comunicação pessoal Dr. Guillermo Seijo).



Figura 17: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis hoehnei* V 13985.

Com *A. microsperma* as plantas mostraram desenvolvimento normal, mas ainda sem a produção de flores. Os híbridos com as espécies do genoma A, *A. kempff-mercadoi*, *A. schininii*, *A. microsperma* (Figura 18 A e B) e *A. stenosperma* (Figura 19 A e B), por formarem híbridos AB com *A. gregoryi* são materiais de interesse direto para ações de pré-melhoramento. Além de terem o conjunto genômico similar ao de *A. hypogaea* apresentam resistência às doenças foliares causadas por *Cercospora arachidicola* (mancha castanha), *Cercosporidium personatum* (mancha preta) e *Puccinia arachidis* (ferrugem) (Fávero, 2004; Fávero et al., 2009; Custodio, 2005).



Figura 18: A) Germinação espontânea do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis microsperma* V 14042. B) Plântula do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis microsperma* V 14042.



Figura 19: A) Germinação espontânea do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis stenosperma* V 10309. B) Plântula do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis stenosperma* V 10309.

Outros híbridos envolvendo diferentes acessos de *A. gregoryi* e *A. stenosperma* foram feitos por Fávero (2004) e Simpson & Valls (2006), tendo a viabilidade de pólen variado entre 0,4 a 4,9%. No presente trabalho não foi possível verificar a porcentagem de viabilidade do pólen desses híbridos, pois os que apresentaram germinação espontânea e bom desenvolvimento inicial, passadas algumas semanas, não continuaram com o desenvolvimento esperado, geralmente com morte do eixo central. Restam as ramificações laterais, que continuam vivas, mas com lento desenvolvimento.

Com *A. schininii*, foram produzidos 14 segmentos de fruto que, originaram plantas com eixo central anormal, curto e ramos muito proliferados, entretanto, com ótima sobrevivência (Figura 20).



Figura 20: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis schininii* V 9923.

Com *A. kempff-mercadoi*, foram produzidos 17 segmentos de fruto que, originaram plantas com eixo central normal, e ramos laterais ascendentes (Figura 21).



Figura 21: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis kempff-mercadoi* V 13250.

O cruzamento entre *A. gregoryi* com *A. vallsii* produziu 22 segmentos de fruto resultando em 10 plântulas, cuja origem híbrida ainda não pode ser confirmada, pelo lento desenvolvimento, embora os folíolos pareçam muito estreitos para que as plantas sejam de origem maternal. Rodrigues (2006) realizou o cruzamento recíproco com o mesmo acesso de *A. vallsii* e o acesso de *A. gregoryi* V 6389. As duas sementes resultantes originaram plântulas fracas, que não se desenvolveram. Diante do vigoroso crescimento das plântulas maternas de *A. vallsii*, observado no trabalho de Rodrigues, supõe-se ter havido hibridação. A eventual confirmação de hibridação entre *A. gregoryi* e *A. vallsii* neste novo programa de cruzamentos poderá fornecer dados muito importantes em favor da

alocação de *A. vallsii* na secção *Arachis*, espécie inicialmente situada na secção *Procumbentes* (Krapovickas & Gregory, 1994), tema discutido por Rodrigues (2006). Com base em estudos citológicos recentes, Lavia et al., (2008) propõe formalmente esta transferência.

O segundo grupo engloba quatro cruzamentos: *A. gregoryi* V 14957 x *A. valida* V 13514 (9,6%), *A. magna* K 30097 (9,5%), *A. villosa* V 14309 (8,2%), *A. diogoi* Vp 5000 (5,4%), os dois primeiros associados ao genoma B e os dois últimos ao genoma A.

No cruzamento de *A. gregoryi* com *A. villosa*, apesar da baixa percentagem de sucesso de polinização, 8,2%, foram obtidas quatro plântulas. Uma morreu e as outras três continuam com bom desenvolvimento, mas até o presente sem florescimento.

Foi possível fazer estaca desse material, garantindo assim um maior número de plantas. A hibridação foi facilmente confirmada por descritores morfológicos, devido à alta pilosidade na face adaxial do folíolo presente no pai e ausente na mãe, ou seja, o material F₁ apresenta as características paternas (Figura 22).



Figura 22: Característica do marcador morfológico paterno pilosidade na face adaxial do folíolo do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis villosa* V 14309.

O híbrido feito por Fávero (2004) entre *A. gregoryi* V 6389 x *A. villosa* V 12812 apresentou porcentagem de sucesso de 0,92%, menor que a conseguida no atual trabalho e viabilidade do pólen de 7,67%. O material pode ser interessante em pesquisas de pré-melhoramento, uma vez que os híbridos contêm os genomas, A e B, do amendoim cultivado.

O híbrido entre *A. gregoryi* e *A. diogoi* pode ser uma interessante via para o melhoramento de *A. hypogaea*, já que a espécie paternal vem sendo utilizada em cruzamentos interespecíficos, visando à incorporação de suas características no amendoim cultivado (Figura 23). A importância de *A. diogoi* em cruzamentos interespecíficos está associada a sua possível tolerância a ambientes alagadiços, uma vez que a espécie ocorre naturalmente próxima a cursos de água e sujeita a inundações periódicas no Pantanal do Mato Grosso do Sul (Krapovickas & Gregory, 1994) além de, mostrar resistência à mancha castanha, mancha preta, trips e cigarrinha (Varman et al., 2000; Fávero, 2004).



Figura 23: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis diogoi* Vp 5000.

A introgressão de genes das espécies silvestre para *A. hypogaea* foi concentrada, nas últimas décadas, nas espécies da secção *Arachis* que possuem o par de cromossomos A. Isso ocorreu devido à baixa disponibilidade de materiais dessa secção, que fossem diplóides e que não apresentassem o par de cromossomos A. Os materiais que se mostraram mais promissores envolveram *A. cardenasii*, *A. diogoi* e *A. duranensis* (Simpson, 1997; Stalker et al., 1979, 1989).

A cultivar COAN lançada por Simpson & Starr (2001), resistente a nematóides de galhas (*Meloidogyne arenaria* e *M. javanica*) foi obtida a partir de cruzamentos entre *A. cardenasii* e *A. diogoi*. Este híbrido foi cruzado com *A. batizocoi*, dando origem a um híbrido estéril, que foi tratado com colchicina para duplicação dos cromossomos gerando o anfidiplóide sintético TxAg-6. Esta linhagem sintética foi cruzado com *A. hypogaea* cv. Florunner e, após retrocruzamentos e seleção para caracteres agronômicos e resistência a nematóides, resultou na cultivar referida. No Brasil, *A. diogoi* foi usado por Pompeu (1983) para produzir híbridos com *A. hypogaea*. Os híbridos de *A. gregoryi* com *A. diogoi* ainda não floresceram não sendo possível estimar sua viabilidade de pólen.

O híbrido de *A. gregoryi* com *A. magna* K 30097 (Figura 24) apresentou média de viabilidade de pólen de 7,12%.

Valores semelhantes foram obtidos por Simpson & Faries, (2001), ao analisarem o pólen de híbridos entre estas duas espécies, porém envolvendo acessos diferentes. Isto indica que, embora *A. gregoryi* e *A. magna* apresentem características morfológicas muito próximas e que algumas vezes se confundem sendo difícil separar alguns de seus acessos, e de estas espécies terem algumas populações simpátricas, elas devem ter desenvolvido barreiras genéticas, que as mantêm reprodutivamente isoladas e permitem sua manutenção como espécies distintas.

No híbrido de *A. gregoryi* com *A. valida*, os ramos laterais se mostraram bem desenvolvidos, com medida superior a 2,5m. As plantas apresentaram intensa floração com viabilidade média de pólen de 5,45%.



Figura 24: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis magna* K 30097.

Apesar da baixa viabilidade, houve a formação de um “peg”, com um segmento de fruto (Figura 25 A e B). Embora bem formado, o segmento de fruto não completou seu desenvolvimento, tendo-se degradado no interior do solo. *Arachis valida* tem valor para ações de pré-melhoramento por apresentar características de resistência às manchas foliares e, possivelmente ao alagamento devido às características do ambiente em que ocorrem suas populações (Krapovickas & Gregory, 1994; Fávero, 2004).

O terceiro grupo apresenta 15 combinações híbridas envolvendo materiais que representam os genomas A, B, D e AB. Este grupo abrange os híbridos *A. gregoryi* V 14957 x *A. hypogaea* var. *aequatoriana* Mf 1678 (3,6%), *A. krapovickasii*

Wi 1291 (3,5%), *A. ipaënsis* K 30076 (2,8%), *A. helodes* V 6325 (2,7%), *A. cruziana* Wi 1302-2 (2,5%), *A. simpsonii* V 13728 (2,5%), *A. magna* V 14724 (2,2%), *A. hypogaea* var. *hirsuta* Mf 1538 (2,0%), *A. gregoryi* V 14753 (1,7%), *A. glandulifera* V 13738 (1,7%), *A. benensis* K 35005 (1,4%), *A. hypogaea* var. *fastigiata* cv. Tatu (1,4%), *A. batizocoi* K 9484 (1,2%), *A. duranensis* V 14167 (1,1%) e *A. hoehnei* K 30006 (0,6%). Além do híbrido intraespecífico *A. gregoryi* V 14957 x *A. gregoryi* V 14753 (1,7%).

No cruzamento com a cv. Tatu de *A. hypogaea* var. *fastigiata* foram produzidos 31 segmentos de fruto, com o aborto de 14. Foram colocadas a germinar 11 sementes e apenas uma se desenvolveu gerando um híbrido triplóide, cuja hibridação pode ser confirmada pela contagem do número de cromossomos (Figura 26 A e B). As demais sementes permaneceram imaturas e não germinaram.

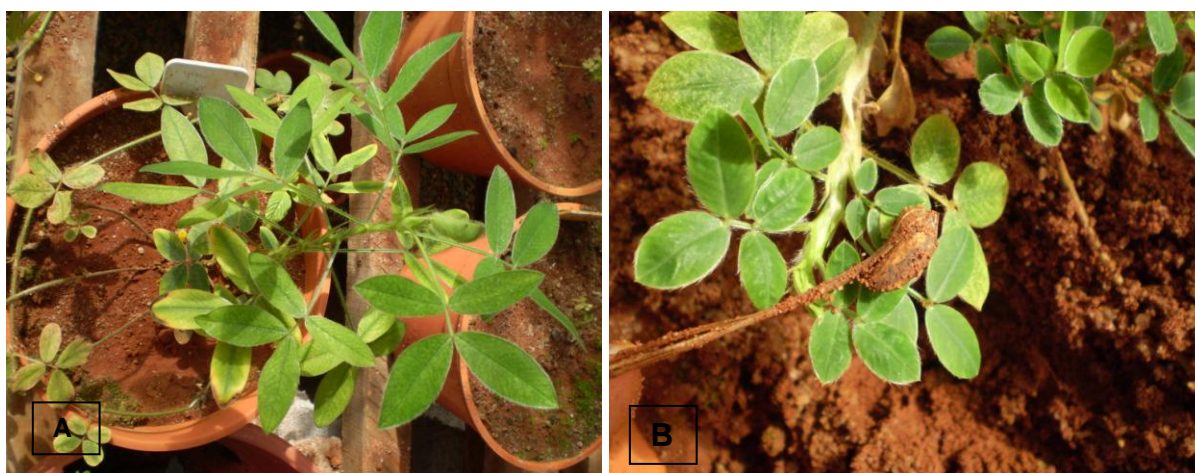


Figura 25: A) Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis valida* V 13514. B) Segmento de fruto formado pelo híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis valida* V 13514.

A planta mostrou crescimento lento, mas com bom aspecto, não chegando a florescer.

No cruzamento com *A. hypogaea* var. *aequatoriana* dos 46 frutos formados 32 foram abortados e com a var. *hirsuta* dos 13 frutos formados três sofreram aborto. Os demais frutos foram colocados para germinar, mas a maioria das plântulas morreu nos estágios iniciais de desenvolvimento, sobrevivendo apenas quatro plantas do cruzamento com a var. *aequatoriana* e uma daquela com a var *hirsuta*. Em ambos os cruzamentos houve aborto do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento.

A manipulação de híbridos triplóides é laboriosa, exigindo várias etapas, dependendo do objetivo do programa e da viabilidade do germoplasma. Primeiro é necessário tratar o material com colchicina para a duplicação do número cromossômico, tornando-o um hexaplóide fértil; este hexaplóide deve ser retrocruzado com *A. hypogaea* até a progênie voltar a ter 40 cromossomos, devido à perda de cromossomos (Simpson, 1991; 2001). Apesar dessas etapas, os materiais aqui obtidos podem ser usados como mais uma via alternativa para o melhoramento do amendoim.

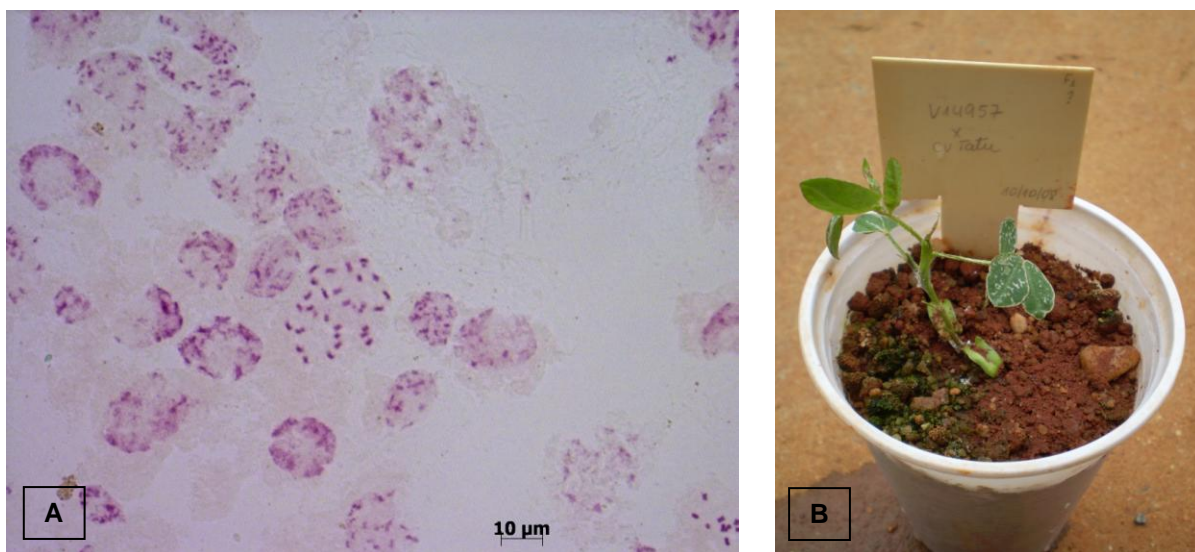


Figura 26: A) Cromossomos do híbrido triplóide de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis hypogaea* cultivar Tatu. B) Plântula do híbrido triplóide de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis hypogaea* cultivar Tatu.

No cruzamento de *A. gregoryi* com *A. glandulifera*, duas espécies com genomas distintos, respectivamente B e D, foram produzidos 27 segmentos de frutos, porém, em 25 desses segmentos bem formados não houve a formação de semente, apenas de um pequeno resquício do que viria a ser um embrião. Isto indica que houve preparo da parte maternal para a formação de fruto e da semente, porém sem desenvolvimento desta última estrutura, talvez devido a aborto do embrião nos seus estágios iniciais. As duas outras sementes, uma bem formada e outra pouco desenvolvida, foram germinadas e formaram plântulas, mas apenas uma delas se desenvolveu. A hibridação foi facilmente confirmada pela presença de glândulas na face abaxial dos folíolos do híbrido, caráter herdado do pai, que como o próprio nome sugere, possui tais glândulas (Figura 27). O híbrido apresentou média de viabilidade de pólen de 0,3%. O valor baixo da viabilidade do pólen desse híbrido indica que os parentais envolvidos apresentam grande distância genética entre si.



Figura 27: Característica do marcador morfológico paterno glândulas na face abaxial do folíolo do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis glandulifera* V 13738.

Fatos semelhantes a este, envolvendo cruzamentos de outros pares de espécies foram relatados na literatura especializada por Johansen & Smith (1956), Smartt & Gregory (1967), Pompeu (1977) e Gregory & Gregory (1979) indicando a formação de frutos menores, que aqueles produzidos por autofecundação, contendo apenas um resquício da semente, abortada logo nos estágios iniciais de desenvolvimento. Eles relatam que o início do desenvolvimento do embrião e do endosperma é retardado, cessando a seguir, acompanhado pela hipertrofia da testa da semente, sendo que algumas vezes, o embrião e o endosperma morrem sem diferenciação.

Arachis glandulifera, pertencente à secção *Arachis*, foi descrita por Stalker (1991), como portadora do genoma D, com fórmula cariotípica $2n=2x=20$, com cariótipo assimétrico, com inversões e translocações, o que a diferencia das demais espécies da secção *Arachis*. A atribuição de um genoma peculiar a esta espécie foi confirmada por Robledo & Seijo (2008), em análise citogenética com hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A espécie mostra tricomas glandulares nas partes vegetativas e no “peg”, tendo o fruto bastante reticulado.

Híbridos intra e interespecíficos, envolvendo *A. glandulifera*, foram produzidos por Stalker (1991a). Esse autor relata que os híbridos intraespecíficos foram de obtenção relativamente difícil, com um sucesso de polinização de 7,2%. Também foram feitos cruzamentos interespecíficos de *A. glandulifera* com *A. batizocoi*, *A. duranensis* e duas cultivares de *A. hypogaea*. Os híbridos com as duas primeiras espécies foram estéreis. Os híbridos com *A. batizocoi* apresentaram grandes diferenças morfológicas, conforme o acesso de *A. glandulifera* usado no cruzamento. Apesar de terem sido feitas 835 polinizações, nos dois sentidos, entre *A. glandulifera* e as duas cultivares de *A. hypogaea* (que representam suas duas subespécies), nenhum híbrido foi obtido. A falha na obtenção de híbridos com *A. hypogaea*, pode ser devido a eventos desfavoráveis tanto de pré como de pós-fertilização, pois poucos “pegs” foram produzidos e, a pequena porcentagem de frutos por eles formados continha apenas embriões reduzidos ao tempo normal de maturação (Stalker et al., 1991).

Aparentemente, as diferenças cariotípicas de *A. glandulifera*, em relação aos demais representantes da secção *Arachis*, pode representar uma barreira reprodutiva para a espécie, quanto aos cruzamentos interespecíficos. Porém, a espécie apresenta alta prolificidade por autofecundação.

Deste terceiro grupo, oito materiais cruzados eram associados ao mesmo genoma aqui atribuído a *A. gregoryi* (B). Duas combinações híbridas, de *A. gregoryi* com *A. batizocoi* K 9484 e com *A. hoehnei* K 30006, apresentaram problemas nas fases iniciais de desenvolvimento. Diante desta situação, as sementes produzidas nos vasos de cruzamentos foram colhidas, algumas já tendo iniciado a germinação. As plântulas e as sementes obtidas foram submetidas a técnica de cultura de tecidos, para o resgate *in vitro* do embrião e das plântulas. O material resultante encontra-se mantidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Hortaliças/CNPH, no Distrito Federal.

No cruzamento com *A. batizocoi*, foram realizadas 82 polinizações, com a obtenção de 61 segmentos de fruto. Desses, 46 sementes germinaram espontaneamente e 15 frutos foram submetidos para o cultivo *in vitro*. Todavia, não houve o desenvolvimento da parte aérea nas plântulas (Figura 28).



Figura 28: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis batizocoi* K 9484 em que não houve o desenvolvimento da parte aérea

Apenas uma plântula se desenvolveu sob condição de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças/CNPH (Figura 29). Transferida para o telado na Embrapa/Cenargen em pouco tempo definhou e morreu.

Os embriões resgatados *in vitro* estão se desenvolvendo e foram transferidas para um meio de cultura para o desenvolvimento de raízes, para posterior aclimação e transferência para vasos.

Um híbrido entre *A. gregoryi* V 6389 e o mesmo acesso de *A. batizocoi* (K 9484) aqui utilizado foi feito por Simpson & Faries (2001), mostrando desenvolvimento normal e viabilidade de pólen de 4,5%. Apesar dos dois acessos de *A. gregoryi*, (V 14957 e V 6389), terem as populações naturais muito próximas, e possivelmente guarda diferenças genéticas entre si ou que se comportam diferencialmente dependendo da condição ambiental em que são manipuladas.



Figura 29: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis batizocoi* K 9484 que se desenvolveu sob condições de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças.

Outro cruzamento em que os híbridos tiveram que ser resgatados *in vitro* foi entre *A. gregoryi* V 14957 com *A. hoehnei* K 30006. Neste, as plântulas iniciavam com bom desenvolvimento, embora muito atacadas por ácaros, como ocorre no acesso paterno e, depois regrediam, culminando na morte do material. Deste cruzamento, foram obtidas 59 sementes, 43 dos quais germinaram espontaneamente, sobrevivendo 19, enquanto foram resgatados *in vitro* os embriões das outras 16 (Figura 30). Apenas uma das plântulas se desenvolveu sob as condições de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças/CNPH e mais tarde, nas condições de telado na Embrapa/Cenargen (Figura 31). Esta planta apresenta muitas ramificações laterais de porte ascendente-ereto. A viabilidade de pólen deste híbrido foi de 12% sendo os extremos dessa média 9% e 18,2%. O acesso de germoplasma *A. hoehnei* K 30006 provém da mesma população natural de origem do exemplar tipo da espécie, descrita na monografia do gênero *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994).



Figura 30: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis batizocoi* K 9484 mantidos *in vitro* na Embrapa Hortaliças.



Figura 31: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis hoehnei* K 30006 que se desenvolveu sob condições de casa de vegetação na Embrapa Hortaliças.

Dois outros cruzamentos, de *A. gregoryi* com *A. krapovickasii* e com *A. cruziana*, cujos genitores masculinos são possivelmente mais associados a *A. batizocoi*, mostraram comportamentos distintos.

Com *A. krapovickasii*, foram formados 19 segmentos de fruto. As sementes germinaram espontaneamente, gerando plântulas vigorosas, mas que não continuaram com o desenvolvimento esperado, definhando ao longo do tempo (Figura 32 A e B). Apenas uma planta sobreviveu, após ter sido transferida para uma casa de vegetação nas dependências da Embrapa/Cenargen. Floresceu apenas em 2009, permitindo a estimativa de viabilidade de 0,4%. Em cruzamento das mesmas duas espécies, porém com acesso diferente de *A. gregoryi*, Simpson & Faries (2001) estimaram a viabilidade de pólen foi de 12,8%.



Figura 32: A) Plântula do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis krapovickasii* Wi 1291. B) Planta adulta do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis krapovickasii* Wi 1291 em florescimento.

Com *A. cruziana*, foram formados 36 segmentos de fruto. As plântulas sempre foram vigorosas, formando plantas adultas com ramos laterais longos, com comprimento acima de 2,5m e com intensa floração (Figura 33). O valor médio de viabilidade do pólen foi de 5,22%. Cruzamentos envolvendo outro acesso de *A. gregoryi* e o mesmo de *A. cruziana* apresentaram valores de coloração do pólen dos híbridos de 3,8% (Valls & Simpson, 2005; Simpson & Faries, 2001). Apesar da diferenças dos resultados, os dois valores são baixos, o que teoricamente torna improvável a ocorrência de autofecundação no híbrido obtido.

Os cruzamentos envolvendo *A. gregoryi* com *A. ipaënsis* (Figura 34) e com *A. magna* V 14724, cujos genitores masculino e feminino são morfologicamente muito próximos, apresentaram, respectivamente, 39 segmentos de fruto, que não tiveram germinação espontânea e mostraram viabilidade de pólen de 5,4% e, quatro segmentos de frutos com germinação espontânea e viabilidade de pólen de 10,45%. A produção destes híbridos é importante para o entendimento das relações de proximidade entre essas três espécies.



Figura 33: Plântula do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis cruziana* Wi 1302-2.



Figura 34: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis ipaënsis* K 30076.

Por muito tempo, *A. batizocoi* foi considerado como a possível fonte do genoma B de *A. hypogaea*. A obtenção de novos acessos de germoplasma e sua submissão cada vez mais intensa às técnicas de caracterização morfológica, citogenética e molecular (Stalker, 1990; Kochert et al., 1991; Fernández & Krapovickas, 1994; Stalker et al., 1994) levaram, em pouco tempo, à exclusão de *A. batizocoi* como provável espécie doadora do genoma sem o “par A” na origem de *A. hypogaea* (genoma “não-A ou B”) e a sugestão de *A. ipaënsis* como a mais provável doador desse genoma e de *A. duranensis* como espécie doadora do genoma A (Kochert et al., 1991). Esta idéia foi respaldada por Fernández & Krapovickas (1994), Kochert et al., (1996) e Seijo et al., (2004), a partir de distintas abordagens, e teve sua viabilidade demonstrada através da produção de um anfidiplóide desses dois genitores propostos e seu cruzamento bem sucedido e fértil com representantes das seis variedades botânicas de *A. hypogaea* por Fávero et al., (2006).

Pesquisas adicionais com marcadores citogenéticos e moleculares (Gimenes et al., 2002a,b; Moretzsohn et al., 2004; Milla et al., 2005; Seijo et al., 2007; Cunha et al., 2008; Burow et al., 2009) mostram que o grupo de espécies diplóides da secção *Arachis* sem o “par A”, (Krapovickas & Gregory, 1994; Peñaloza & Valls, 2005) não é homogêneo, contendo subgrupos, que gravitam em torno de *A. ipaënsis* (*A. gregoryi*, *A. magna*, *A. valida* e *A. williamsii*) e de *A. batizocoi* (*A. cruziana*, *A. krapovickasii*, *A. glandulifera*), mais duas espécies aparentemente isoladas, *A. hoehnei* e *A. benensis*, além de *A. vallsii*, originalmente alocada na secção *Procumbentes*, mas capaz de produzir híbridos com os subgrupos citados e mesmo com *A. hypogaea*, portanto também um membro da secção *Arachis* (Valls, 2006) além desses diplóides com $2n=2x=20$, a secção *Arachis* ainda abriga três espécies diplóides com $2n=2x=18$ (Lavia 1996, 1998; Peñaloza & Valls, 1997). Stalker et al., (1991) já consideravam a possibilidade de ocorrência de mais de três genomas na secção *Arachis*.

Devido à grande importância de *A. ipaënsis* na origem de *A. hypogaea* e, como até hoje só existe um acesso dessa espécie, seus híbridos formados com as espécies próximas representam ampliação das possibilidades de levar

características das espécies associadas ao genoma B para o melhoramento do amendoim.

Em outro cruzamento envolvendo *A. gregoryi* e *A. benensis*, houve a formação de 25 segmentos de fruto, com germinação espontânea das cinco sementes (Figura 35). A viabilidade do pólen foi bastante baixa de 0,5% indicando grande distância entre esses genitores.



Figura 35: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis benensis* K 30005.

Ainda nesse terceiro grande grupo aparecem cruzamentos que envolvem os genomas A e B, onde *A. gregoryi* foi cruzada com sucesso *A. duranensis*, *A. helodes*, e *A. simpsonii*. Nenhum dos híbridos produziu flores.

As 32 plântulas produzidas no cruzamento com *A. duranensis*, todas resultantes de germinação espontânea, mostrando-se bastante vigorosas nos

estágios iniciais de desenvolvimento, mas que regrediram e morreram com o passar das semanas.

Com *A. helodes*, foram produzidos 22 segmentos de fruto e as plantas apresentam lento desenvolvimento, mas três ainda sobrevivem (Figura 36).

Com *A. simpsonii*, foram produzidos 18 segmentos de fruto. As plantas são vigorosas apresentando bom desenvolvimento, mas apenas três sobrevivem.



Figura 36: Híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis helodes* V 6325.

No cruzamento entre dois acessos de *A. gregoryi* V 14957 x V 14753, oriundos de municípios vizinhos, mas distantes entre si 99 km. Houve a formação de 24 segmentos de fruto. No entanto apenas duas plantas híbridas sobreviveram. A média de sua viabilidade do pólen foi de 43,6%. Apesar de não ocorrer total abertura das anteras e, conseqüente, liberação do grão-de-pólen, as duas plantas produziram muitos “pegs” com espessura média de 0,68mm, praticamente a metade da espessura dos “pegs” apresentada pela genitora feminina. Este material

híbrido F_1 comportou-se como tipicamente anual, secando completamente no final do período reprodutivo. Os segmentos de fruto germinaram espontaneamente no vaso, gerando 10 indivíduos F_2 (Figura 37). Seria de esperar para híbridos pertencentes à mesma espécie viabilidade de pólen mais alta. Apesar da viabilidade do pólen ser, praticamente, a metade da esperada, os híbridos são férteis, indicando que os acessos guardam certas peculiaridades, mas do ponto de vista genético, são bastante próximos entre si.



Figura 37: Geração F_2 do híbrido de *Arachis gregoryi* V 14957 x *Arachis gregoryi* V 14753.

O quarto e último grupo envolvem aqueles cruzamentos em que os materiais resultantes não se estabeleceram não sendo possível confirmar seu caráter híbrido e, por decorrência, estimar a porcentagem de sucesso. Neste grupo encontram-se dois cruzamentos intraespecíficos de *A. gregoryi* V 14957 x V 14767 e V 14962, além daqueles com *A. magna* V 13761 e V 13765, *A. palustris*, *A. hypogaea* var.

hypogaea e o, *A. hypogaea* var. *peruviana*, cv Tatuí, e o material do tipo Xingu, *A. monticola* Sj 2775 e V 14165, *A. paraguariensis* V 7677.

Nos cruzamentos intraespecíficos envolvendo os acessos de V 14767 e V 14962, como genitores masculinos, houve à formação de 30 e de seis segmentos de fruto, respectivamente. Contudo, as plântulas, que começaram com bom desenvolvimento não completaram seu ciclo, morrendo em poucas semanas, sem chegar a florescer. Embora os três acessos envolvidos sejam do mesmo município o acesso V 14962 foi coletado a 2,4 km do local de origem da genitora, enquanto V 14767, uma planta de dimensões avantajadas para a espécie foi coletada a mais de 86 km de distância da mesma.

Nas espécies não estoloníferas ou rizomatosas de *Arachis*, a capacidade de dispersão dos frutos sob o solo, a cada ano, não ultrapassa uns poucos metros (Krapovickas & Gregory, 1994). Em *A. gregoryi*, com longos ramos laterais, o afastamento das sementes pode chegar até a três ou quatro metros de onde originalmente germinou a planta mãe. Desta forma, o avanço linear teórico, a partir do meio da distância entre os acessos V 14957 e V 14767 exigiria, um período mínimo de 21.500 anos. Independente de outros eventuais meios de dispersão a longa distância e da continuidade de fluxo polínico entre as diversas populações da espécie, esta distância cronológica poderia ter dado margem a deriva populacional, talvez conduzindo a um processo de especiação que ainda não afetou as características morfológicas mais diagnósticas, mas com possíveis reflexos genéticos.

Todavia, a impossibilidade de confirmar a hibridação entre os acessos V 14957 e V 14962 não pode ser explicada pelos mesmos argumentos. A área ocupada pela população representada pelo acesso V 14962 em margem de estrada não pavimentada, com freqüente arrastamento de terra para a manutenção viária, pode até ter continuidade com a área da população de origem do acesso da genitora coletado a poucos metros na mesma estrada. Independente de estimativas teóricas para sua eventual distância cronológica, a distância geográfica efetiva de 2,4 km está dentro do raio de ação de insetos polinizadores, de modo

que os dois acessos provenham de uma mesma população natural no que toca ao fluxo gênico.

A dificuldade de hibridação precisa ser atribuída a problemas práticos de execução dos cruzamentos, já que a genitora teve mau desempenho que permitiu apenas 51 polinizações e a produção de segmentos de fruto de 11,76% foi muito inferior às proporções alcançadas nos cruzamentos em que os genitores masculinos foram os acessos V 14767 (46,15%) e V 14753 (20,68%).

Esta mesma justificativa pode ser usada para o mau resultado do cruzamento envolvendo *A. gregoryi* com *A. magna* V 13761 em que a planta mãe não apresentou desenvolvimento satisfatório, demorando muitas semanas para crescer e iniciar a produção de flores. Seus botões florais tinham aspectos murchos, dificultando a castração, e as flores que se abriam no dia seguinte à emasculação eram pequenas e enrugadas, o que certamente afetou negativamente o sucesso da polinização. O mesmo aconteceu no cruzamento com o acesso V 13765, porém com menor severidade. Deste cruzamento, foram produzidos oito segmentos de fruto, cujas sementes germinaram, mas não chegaram a formar plantas adultas.

A falta de sincronia, má qualidade e baixa produção de flores das plantas genitoras também podem ter sido as causas do insucesso na produção de híbridos entre *A. gregoryi* V 14957 e *A. hoehnei* V 9094.

Todos os cruzamentos envolvendo genitores masculinos tetraplóides, produziram segmentos de fruto, mas com aborto do embrião em um grande número de sementes, nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Com o acesso de *A. hypogaea* var. *hypogaea*, de 65 polinizações formaram-se 11 segmentos de fruto. Desses, cinco sofreram aborto. Uma semente germinou espontaneamente no vaso, mas a plântula não sobreviveu. As outras cinco sementes foram postas a germinar, mas as plântulas definharam em poucas semanas.

No cruzamento com o acesso de *A. hypogaea* do tipo Xingu, o genitor masculino produziu poucas flores durante toda a estação. As 20 polinizações resultaram na formação de apenas três segmentos de fruto, todos com embriões abortados.

No cruzamento com a var. *peruviana*, não houve sincronia de florescimento entre os genitores, além da qualidade das flores produzidas pela genitora ter sido insatisfatória. Assim mesmo, foram possíveis 46 polinizações, que resultaram na formação de apenas um segmento de fruto, cuja semente foi colocada para germinar e iniciou a germinação, mas não houve desenvolvimento da plântula.

Já com a var. *vulgaris* (cv. Tatuí), puderam ser feitas mais de 70 polinizações, resultando em 39 segmentos de fruto, 30 dos quais com embriões abortados e um imaturo. As plântulas resultantes de três sementes que germinaram espontaneamente e, de cinco que foram postas a germinar não sobreviveram.

No cruzamento com os dois acessos de *A. monticola* Sj 2775 e V 14165, foram feitas, respectivamente, 37 e 51 polinizações. Com o acesso Sj 2775, houve a formação de 10 segmentos de fruto, sete com embriões abortados e dois imaturos. A plântula desenvolvida pela única semente colocada para germinar, morreu em poucas semanas. Com o acesso V 14165 surgiram oito segmentos de fruto, sete deles imaturos. A plântula resultante da única semente colocada para germinar também não se desenvolveu.

No cruzamento de *A. gregoryi* com *A. palustris*, que envolve materiais com diferentes números cromossômicos, respectivamente, $2x=2n=20$ e $2x=2n=18$, foram produzidos 18 segmentos de fruto todos com sementes. As sementes germinaram, mas 16 plântulas morreram em estágios iniciais. Duas outras plântulas vêm mostrando desenvolvimento muito lento, ainda não sendo possível confirmar seu caráter híbrido.

No cruzamento com *A. paraguariensis* foram realizadas apenas 38 polinizações devido à baixa de produção de flores do acesso paterno. Mesmo assim, foram formados oito segmentos de fruto. Desses, cinco tiveram o embrião abortado nos estágios iniciais; dois tinham sementes imaturas e uma semente bem formada foi posta a germinar, mas a plântula não sobreviveu.

Cruzamentos interseccionais, como esse, são importantes para testar a possibilidade de o material ser usado como ponte para a transferência de características desejáveis entre as seções *Erectoides* e *Arachis*. As espécies da

secção *Erectoides* apresentam características de destacável interesse como resistência a doenças e insetos (Subramahnan et al., 1985), grande capacidade regenerativa (Still et al., 1987) e cruzabilidade com espécies da secção *Caulorrhizae*, *Rhizomatosae* e *Procumbentes* (Rodrigues, 2006)

O conjunto de dados obtidos permite inferir que existe cruzabilidade entre *A. gregoryi* e várias espécies da secção *Arachis* coletadas desde 1976 e associadas, em maior ou menor grau ao genoma B de *A. hypogaea* caracterizado pela ausência do cromossomo “A”.

Embora as espécies da secção *Arachis* sem o par de cromossomos A não formem um conjunto homogêneo e plenamente vinculado ao genoma B de *A. hypogaea*, mas sim subgrupos geneticamente distintos, que gravitam em torno de *A. ipaënsis* (considerada a espécie com genoma mais similar ao genoma B de *A. hypogaea*) *A. batizocoi*, *A. hoehnei*, *A. benensis* e *A. vallsii*, e mesmo um subgrupo com um para menos de cromossomos, *A. gregoryi* formou híbridos com representantes de cada um desses subgrupos, mostrando potencial para a inclusão em trabalhos de pré-melhoramento destinados à formação de linhagens a incorporar ao melhoramento genético do amendoim.

Arachis gregoryi também formou híbridos com espécies associadas ao genoma A de *A. hypogaea*, o que permite a produção de anfidiplóides sintéticos bastante afins ao anfidiplóide disponível (Fávero et al., 2006) de *A. ipaënsis* x *A. duranensis*, já em uso no melhoramento do amendoim. É interessante destacar que entre as espécies associadas ao genoma A, um subgrupo formado por *A. duranensis*, *A. villosa*, *A. correntina* e *A. schininii* é o que tem cromossomos mais similares aos do complemento com cromossomo A de *A. hypogaea* (Seijo et al., 2004; Robledo et al., 2009). À exceção de *A. correntina*, não disponível à época dos cruzamentos, foram obtidos híbridos de *A. gregoryi* com as outras três espécies deste subgrupo, cujos eventuais anfidiplóides, com fertilidade recuperadas poderão mostrar-se muito úteis para o melhoramento do amendoim.

Ainda quanto às espécies diplóides associadas ao genoma A do amendoim, há dois outros subgrupos (“Chiquitano” e “Pantanal”), com maiores diferenças cromossômicas quanto a *A. hypogaea* confirmadas por FISH (Robledo et al., 2009).

Foram obtidos híbridos com as cinco espécies incluídas no subgrupo do Pantanal e, ainda com *A. kempff-mercadoidi*, único genitor masculino utilizado do subgrupo Chiquitano, realçando ampla cruzabilidade de *A. gregoryi*. A partir de um acesso distinto, V 6389, *A. gregoryi* também formou híbridos com *A. linearifolia*, (Fávero, 2004) espécie com o par de cromossomos A (Peñaloza & Valls, 2005) ainda não classificada nos subgrupos por Robledo et al., (2009), mas obviamente mais similar a *A. diogoi* que a outras espécies (Valls & Simpson, 2005) pelo que provavelmente virá a ser enquadrada no subgrupo do Pantanal. Este híbrido, obtido por Fávero (2004), já foi levado à condição tetraplóide, com restauração da fertilidade mostrando estimativas de viabilidade de pólen acima de 70%. O híbrido complexo (*A. ipaënsis* x *A. duranensis*)^{4x} x (*A. gregoryi* x *A. linearifolia*)^{4x} mostrou 51,4% de pólen corado, o que implica boa compatibilidade com a primeira combinação anfidiplóide, que, ao que se sabe, reúne os dois mais prováveis doadores dos genoma de *A. hypogaea* (Silva & Fávero, 2006).

Assim como nos cruzamentos conduzidos por Fávero (2004), entre diversos pares de espécies diplóides da secção *Arachis*, os presentes resultados não mostram coerência entre a facilidade de cruzamento e porcentagem de sucesso e a viabilidade de pólen dos híbridos obtidos. A estimativa de viabilidade mais alta contemplou um híbrido interespecífico entre os acessos V 14957 x V 14753 de *A. gregoryi*, combinação que, embora já tenha sido capaz de produzir sementes F₂, teve um percentual de sucesso relativamente baixo (1,7%).

Grande parte dos cruzamentos com percentual de sucesso dos cruzamentos entre 17,1 e 8,2% deu origem a híbridos incapazes de produzirem flores (*A. gregoryi* x *A. hoehnei* V 13985, *A. kempff-mercadoidi*, *A. schininii*, *A. microsperma*, *A. stenosperma*, *A. villosa*, o primeiro genitor masculino aparentemente sem o par de cromossomos A, mas distantemente associado ao genoma B de *A. hypogaea* e as demais com o referido par.

Por outro lado, três outras combinações, em que os genitores masculinos definitivamente não apresentam o par A, mostraram porcentagens de sucesso equivalentes (14,3 a 9,5%), mas com distintas estimativas de viabilidade de pólen. *Arachis batizocoi* enquadra-se em um grupo de espécies associadas ao genoma B

de *A. hypogaea*, mas não o mais similar, e teve porcentagem de sucesso de 14,3% e estimativa de viabilidade de pólen de 2,6%. As outras duas espécies, mais associadas a *A. ipaënsis* e, portanto, mais próximas do genoma B de *A. hypogaea*, alcançaram porcentagens de sucesso e estimativas de viabilidade de pólen de, respectivamente, 9,6 e 5,45% (*A. valida*) e 9,5 e 7,1% (*A. magna* K 30097), certamente indicativas de maior similaridade com *A. gregoryi*.

É interessante mencionar que outro acesso de *A. magna* (V 14724) alcançou estimativa de viabilidade de pólen ainda mais alta (10,45%), mas sua porcentagem de sucesso foi bastante baixa (2,2%). Na mesma situação enquadram-se os híbridos de *A. gregoryi* com *A. ipaënsis* (sucesso de 2,8% e viabilidade de 5,45%) e *A. cruziana* (2,5 e 5,22%). Situação contrária foi mostrada por *A. williamsii*, com 14,3% de sucesso e apenas 2,6% de viabilidade.

Por fim, os resultados obtidos com o acesso típico de *A. hoehnei* K 30006 (0,6% de sucesso e 12,5% de viabilidade estimada) contrastam com aqueles do acesso V 13985 da mesma espécie acima citada (17,1% de sucesso, mas sem floração). Todavia cabe lembrar a indecisão ainda presente sobre a circunscrição de *A. hoehnei*, espécie cuja descrição original incluía o táxon hoje segregado como *A. schininii* e, além da população típica (K 30006), um grupo de acessos coletados a leste e sudoeste de Corumbá, do qual V 13985 faz parte, grupo este ainda não completamente caracterizado dos pontos de vista citogenético e molecular.

A tabela 8 apresenta o resumo dos resultados dos cruzamentos realizados, como foi o desenvolvimento das plântulas híbridas obtidas e o encaminhamento dado às plântulas sobreviventes.

Tabela 8: Genitores e acessos envolvidos nos cruzamentos, porcentagem de viabilidade do grão-de-pólen dos genitores por coloração (VPPC) e germinação (VPPG), porcentagem viabilidade do grão-de-pólen dos híbridos por coloração (VPH), número de segmentos de frutos produzidos por cruzamento (NSF), número de híbridos confirmados (NH), desenvolvimento das plântulas híbridas: falta de sincronia de florescimento entre os genitores (FSG), baixa qualidade das flores dos genitores (BQG), aborto do embrião (AE), morte nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas (MEI), material cultivado *in vitro* (IV), plântulas com bom desenvolvimento (PBD) e encaminhamento dos híbridos ao pré-melhoramento (EPM).

Genitores	Acessos	% VPPC	% VPPG	% (VPH)	NSF	NH	Híbridos	EPM
<i>A. ipaënsis</i> ¹	K 30076	94,55	78,95	-	10	0	MEI	não
<i>A. ipaënsis</i> ²	K 30076	94,37	83,75	5,4	39	3	PBD	sim
<i>A. gregoryi</i> ¹	V 14753	93,9	75,75	43,6	24	2	MEI	sim
<i>A. gregoryi</i> ¹	V 14767	95,25	81,3	-	30	0	MEI	não
<i>A. gregoryi</i> ¹	V 14962	84,57	73,8	-	6	0	FSG/MEI	não
<i>A. magna</i> ¹	V 13761	94,17	84,1	-	0	0	FSG/BQG	não
<i>A. magna</i> ¹	V 13765	96,62	72,15	-	8	0	BQS/MEI	não
<i>A. magna</i> ¹	V 14724	98,62	72,15	10,45	4	2	PBD	sim
<i>A. magna</i> ¹	K 30097	99,17	82,45	7,12	11	4	PBD	sim
<i>A. cruziana</i> ¹	Wi 1302-2	98,37	87,4	5,22	36	3	PBD	sim
<i>A. williamsii</i> ¹	Wi 1118	97,65	79,35	2,6	28	10	PBD	sim
<i>A. valida</i> ¹	V 13514	71,92	60,05	5,45	36	11	PBD	sim
<i>A. batizocoi</i> ¹	K 9484	89,6	86,2	Nf	61	1	IV/MEI	sim
<i>A. krapovickasii</i> ¹	Wi 1291	93,7	86,15	0,4	19	2	MEI	sim
<i>A. hoehnei</i> ¹	K 30006	90,2	78,85	12	59	1	IV/MEI	sim
<i>A. hoehnei</i> ¹	V 9094	-	-	-	0	0	FSG/BQG	não
<i>A. hoehnei</i> ²	V 13985	93,85	82,1	Nf	34	19	PBD	sim
<i>A. benensis</i> ²	K 35005	93,8	86,55	0,6	25	1	PBD	sim
<i>A. vallsii</i> ¹	V 7635	88,6	73,1	-	0	0	FSG/BQG	não
<i>A. vallsii</i> ²	V 7635	94,3	81,15	Nf	22	10	PBD	sim
<i>A. glandulifera</i> ¹	V 13738	95,85	60,65	0,3	27	1	AE/PBD	sim
<i>A. hypogaea "tipo Xingu"</i> ²	V 12549	62,8	50,25	-	3	0	FSG	não
<i>A. hypogaea var. aequatoriana</i> ²	Mf 1678	76,82	69,25	Nf	46	4	AE/MEI	sim
<i>A. hypogaea var. fastigiata</i> ²	cv Tatu	69,57	57,75	Nf	31	1	AE/MEI	sim
<i>A. hypogaea var. hirsuta</i> ²	Mf 1538	90,95	72,85	Nf	13	1	AE/MEI	sim
<i>A. hypogaea var. hypogaea</i> ²	V 12548	83,27	72,65	-	11	0	AE/MEI	não
<i>A. hypogaea var. peruviana</i> ²	Mf 1560	88,12	74,95	-	1	0	FSG/BQG/MEI	não
<i>A. hypogaea var. vulgaris</i> ²	cv Tatuí	88,15	72,25	-	39	0	AE/MEI	não
<i>A. monticola</i> ²	Sj 2775	90,9	82,3	-	10	0	AE/MEI	não
<i>A. monticola</i> ²	V 14165	81,1	78,3	-	8	0	AE/MEI	não
<i>A. palustris</i> ²	V 13023	86,1	75,85	-	18	0	MEI	sim

Genitores	Acessos	% VPPC	% VPPG	% (VPH)	NSF	NH	Híbridos	EPM
<i>A. diogo</i> ¹	Vp 5000	90,27	68,5	-	4	0	FSG	não
<i>A. diogo</i> ²	Vp 5000	95,45	88	Nf	20	3	PBD	sim
<i>A. duranensis</i> ¹	V 14167	87,95	82,2	-	0	0	FSG/BQG	não
<i>A. duranensis</i> ²	V 14167	91,55	82,35	Nf	32	1	MEI	não
<i>A. helodes</i> ²	V 6325	46,75	41,7	Nf	22	3	PBD	sim
<i>A. kuhlmanni</i> ²	V 13779	74,97	67,25	4,8	24	12	PBD	sim
<i>A. kempff-mercado</i> ²	V 13250	61,92	41,9	Nf	17	7	PBD	sim
<i>A. microsperma</i> ²	V 14042	95,4	86,1	Nf	8	8	PBD	sim
<i>A. schinini</i> ¹	V 9923	97,17	87,45	Nf	5	1	PBD	sim
<i>A. schinini</i> ²	V 9923	92,25	77,9	Nf	14	11	PBD	sim
<i>A. stenosperma</i> ¹	V 10309	92,75	84,95	-	0	0	FSQ/BQG	não
<i>A. stenosperma</i> ²	V 10309	84,22	78,9	Nf	27	16	MEI	não
<i>A. simpsoni</i> ²	V 13728	81,42	66,95	Nf	18	2	PBD	sim
<i>A. villosa</i> ¹	V 14309	93,97	84,2	Nf	4	4	PBD	sim
<i>A. paraguariensis</i> ²	V 7677	87,5	79,45	-	8	0	AE/MEI	não

¹ primeiro ano de cruzamento 2006/2007.

² segundo ano de cruzamento 2007/2008.

Nf= não houve florescimento.

Grupo 1 em vermelho (% de sucesso de 17,1 – 11,9)

Grupo 2 em verde (% de sucesso de 9,6 – 5,4)

Grupo 3 em azul (% de sucesso de 3,6 – 1,7)

Grupo 4 materiais que não se estabeleceram não sendo possível confirmar seu caráter híbrido

6.3- ANÁLISE MOLECULAR

Na análise molecular, foi estimada a diversidade alélica entre 96 acessos pertencentes a 35 diferentes espécies do gênero *Arachis*.

Os marcadores utilizados foram desenvolvidos para *A. hypogaea*, mas a alta diversidade alélica encontrada, para a maioria dos locos, demonstra que houve uma alta transferibilidade da maior parte dos marcadores para as diferentes espécies analisadas.

O nível de polimorfismo de cada marcador foi estimado pelo cálculo de número de alelos e genótipos por loco, heterozigosidade esperada e observada e pelos valores do conteúdo informativo de polimorfismo/PIC (Tabela 9). O número de alelos por loco foi bastante variável, com média de 21,63, variando de três alelos no marcador GI-338 a 42 no marcador TC7H11.

Tabela 9: Número de indivíduos analisados (N), número de alelos (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), encontrados para cada um dos 30 locos microsatélites analisados em 96 acessos de *Arachis* spp.

Loco	N	NA	He	Ho	PIC
TC3E02	37	23	0,9379	0,4054	0,9379
TC7G10	67	39	0,9590	0,5074	0,9590
AC2H11	91	22	0,8840	0,1310	0,8840
TC6E01	94	22	0,9216	0,1489	0,9216
RN2C06	93	10	0,5708	0,1182	0,5708
TC1A02	78	27	0,9540	0,1025	0,9540
GI-1107	60	21	0,7886	0,0666	0,7886
TC6H03	94	30	0,9451	0,1808	0,9451
RN22G07	92	7	0,2934	0,0217	0,2934
TC11A02	78	16	0,8968	0,1410	0,8968
TC4F12	23	10	0,8657	0,0000	0,8657
TC7A02	92	37	0,9607	0,2391	0,9607
GI-832	85	13	0,8217	0,1058	0,8217
GI-338	75	3	0,4989	0,0533	0,4989
TC7E04	60	19	0,9369	0,0333	0,9369
TC2A02	87	37	0,9616	0,1494	0,9616
TC7H11	85	42	0,9681	0,2588	0,9681
TC1D02	93	18	0,9323	0,1397	0,9323
GI-342	89	30	0,9511	0,1910	0,9511
TC2B09	75	15	0,8798	0,1733	0,8798
AC2B03	73	26	0,9341	0,1506	0,9341
RI1F06	80	26	0,9469	0,2000	0,9469
TC9F10	89	25	0,9122	0,3707	0,9122
TC6G09	95	18	0,9154	0,0631	0,9154
TC3H02	11	5	0,7792	0,0000	0,7792
TC11A04	84	28	0,9507	0,1428	0,9507
TC7C06	96	26	0,9122	0,0104	0,9122
TC1E01	69	38	0,9641	0,2463	0,9641
TC11H06	11	8	0,9004	0,0000	0,9004
RN8C09	77	8	0,4978	0,0129	0,4978
média	74,4333	21,6333	0,8547	0,1455	0,8547

Na maioria, os valores de heterozigosidade esperada foram superiores a 0,49, sendo a média de 0,85. Considerando que valores próximos a 1,0 indicam alto nível de indivíduos heterozigotos e o fato de que as espécies de *Arachis* serem consideradas predominantemente autógamas, esses valores indicam que os materiais das espécies silvestres podem contribuir significativamente para ampliar a base genética do amendoim.

Os valores do PIC refletem a diversidade e frequência alélica entre os acessos (Blair et al., 2002). Os locos estudados mostram elevados valores com média de 0,85, ideais para serem utilizados em testes de paternidade e/ou identidade, podendo ser explicados pela utilização de marcadores muito informativos (Akkaya & Buyukunal-Bal, 2004) ou pelo uso de diversas espécies silvestres que possuem uma grande variabilidade genética.

Os valores de heterozigosidade observada para os locos TC3H02, TC4F12, e TC11H06 foram iguais a zero, talvez devido a baixa transferibilidade desses locos para as espécies em pauta.

A distância genética dos 96 acessos, foi estimada entre 0 a 0,65. A partir da matriz de distância genética, foi construído o dendrograma baseado no método UPGMA (Figura 38). A consistência do agrupamento foi testada pelo coeficiente de correlação cofenético ou Coeficiente de Correlação de Mantel (r) gerando um valor de 0,816. Logo, a matriz cofenética e a matriz de distâncias genéticas mostraram uma correlação significativa de 81,6%. Os dados obtidos mostraram uma separação consistente das espécies, de acordo com os genomas a elas atribuídos. De modo geral, os acessos pertencentes a uma mesma espécie tenderam a se agrupar.

Foram obtidos nove grupos principais:

O primeiro e grande grupo corresponde às espécies em geral associadas na literatura ao genoma B de *A. hypogaea*, com a adição de *A. glandulifera*, portadora do genoma D (Stalker, 1991; Robledo et al., 2008), e com duas exceções, de difícil explicação: a inclusão, neste grupo, de *A. duranensis*, espécie vinculada ao genoma A, e a exclusão de três acessos de *A. magna*.

Este grupo comporta três subgrupos, o primeiro reunindo 12 dos 13 acessos de *A. gregoryi*, um dos quais (V 14960) representativo da população de origem de seu *typus* (faltando o acesso V 14760), os cinco de *A. valida* e o único existente de *A. ipaënsis*, além de dois dos 13 acessos de *A. magna* (V 13748 e 14750).

O agrupamento de *A. gregoryi* e *A. valida* junto a *A. ipaënsis*, que, por sua vez, se vincula aos dois acessos de *A. magna*, mostra a proximidade entre essas espécies, o que pode ser de utilidade para ampliar a base de espécies do genoma

B na introgressão de genes de interesse para o amendoim. A presença do conjunto de acessos de *A. valida* chama a atenção, pois a proximidade com *A. ipaënsis* era esperada, mas ainda não havia sido confirmada.

No segundo subgrupo, encontram-se os dois acessos utilizados de *A. cruziana*, que apresentaram valores de *bootstrap* de 100. Possivelmente, estes dois materiais, recebidos do exterior com as designações Wi 1302-2 e Wi 1302-3, apenas se tratem de progênies de dois indivíduos distintos, mas sem maiores diferenças, originários da mesma população Wi 1302, aos quais apenas foram atribuídas as terminações -2 e -3 para indicar a numeração dos respectivos vasos de multiplicação.

Associados a *A. cruziana* aparecem um dos acessos de *A. hoehnei* (V 7612) e o acesso de *A. duranensis*, a espécie hoje considerada mais intimamente associada ao genoma A de *A. hypogaea*. É difícil explicar a inserção deste último acesso no subgrupo e mesmo no grupo, onde não há outros representantes de espécies vinculadas ao genoma A.

Por sua vez, o acesso V 7612 de *A. hoehnei* foi originalmente coletado, em 1984, no local de um antigo canteiro de uma área experimental, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, que havia sido abandonada, após vários anos de utilização. De acordo com um croqui disponível, o local deveria corresponder ao canteiro onde havia sido multiplicado o acesso típico de *A. hoehnei* (K 30006), a partir de uma amostra de sementes deixada para a atual Embrapa Gado de Corte, pelos coletores, em 1976. Como não houve agrupamento desse acesso com os demais acessos de *A. hoehnei* e, então, não se pode ter certeza absoluta de que realmente corresponda ao acesso K 30006, embora sejam morfologicamente similares, o material disponível do acesso V 7612 deverá ter sua identificação taxonômica minuciosamente revisada.

O terceiro subgrupo é dominado por oito dos 13 acessos de *A. magna*, incluindo a população de origem de seu *typus* (K 30097), mas ainda abrigam os acessos de *A. williamsii*, *A. batizocoi*, *A. krapovickasii* e o acesso V 14760 de *A. gregoryi*, além de *A. benensis* e *A. glandulifera*. Esta última espécie teve seu genoma designado como distinto (genoma D), devido à presença de vários pares

de cromossomos subtelocêntricos e características bastante distintivas, quando analisada por FISH (Stalker, 1991; Fernández & Krapovickas, 1994; Robledo & Seijo, 2008). No entanto, se analisada por marcadores moleculares não vinculados a cromossomos específicos, tende a sempre agrupar-se com o grupo de espécies bolivianas *A. batizocoi*, *A. cruziana* e *A. krapovickasii* (Gimenes et al., 2002b; Santos et al., 2003; Moretzsohn et al., 2004; Milla et al., 2005; Tallury et al., 2005), de onde pode ter-se originado ao longo de um processo de fixação de alterações cromossômicas.

Arachis benensis é a espécie mais peculiar deste primeiro grupo, pois mostra o cromossomo satelitado de tipo 9 (Fernández & Krapovickas, 1994), característico das espécies da secção *Procumbentes*. Todavia, sua inserção no grupo é coerente com a classificação original na secção *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994), associada à presença de $2n=2x=20$ e à ausência do par pequeno de cromossomos, denominado por Husted (1933) como par A (Fernández & Krapovickas, 1994), características que a vinculam a todas as espécies arroladas no primeiro grupo.

O segundo grupo é composto pelos acessos tetraplóides, que incluem os representantes das seis variedades botânicas de *A. hypogaea*, mais os de raças locais desta espécie, com variedades botânicas ainda não confirmadas, cultivadas por indígenas brasileiros no Mato Grosso, e *A. monticola*, espécie que pode estar envolvida na origem e domesticação do amendoim (Lavia et al., 2008). O grupo se mostrou muito consistente, com *bootstrap* de 54,70. Os acessos de *A. hypogaea* evidenciaram forte afinidade de suas seis diferentes variedades botânicas, entre si e com três tipos indígenas brasileiros, identificados, em estudo recente de caracterização de sua diversidade, como Kayabi branco, Nambikwara e Xingú (Freitas et al., 2007). O acesso de *A. monticola* destacou-se do conjunto de acessos de *A. hypogaea*, com distância genética em torno de 0,58.

O terceiro grupo é formado por seis dos sete acessos de *A. hoehnei*, com *bootstrap* de 40,70. Entre eles, encontra-se o acesso correspondente à população de origem do *typus* da espécie (K 30006). Como comentado acima, o único acesso de *A. hoehnei* que ficou fora desse grupo foi V 7612, localizado no primeiro grupo.

Originalmente alocada na secção *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994), esta espécie, com $2n=2x=20$ cromossomos, foi caracterizada como não portadora do par de cromossomos A (Fernández & Krapovickas, 1994), o que, de modo simplista, a colocaria entre aquelas mais associadas ao genoma B de *A. hypogaea* (Holbrook & Stalker, 2003; Milla et al., 2005). Estudos genéticos baseados em marcadores microssatélites e AFLP apoiaram esta classificação (Moretzsohn et al., 2004; Tallury et al., 2005). Porém, análises da filogenia do gênero *Arachis* baseados em ITS (Bechara, 2001) e em seqüências trnT-F (Tallury et al., 2005) posicionam a espécie como mais associada àquelas com o par A (Cunha et al., 2008). Diante dessas incongruências, a espécie ainda não teve seu genoma definitivamente confirmado e os acessos identificados por este nome necessitam de mais estudos, inclusive para verificar se são, realmente, conspecíficos.

O quarto grupo engloba três acessos de *A. magna* (V 13751, V 13765 e V 14707). Os dois últimos correspondem a coletas realizadas em épocas diferentes, mas no mesmo local, no município de Cáceres – MT, e representam a população mais oriental que se conhece da espécie. No entanto, o acesso V 13751 foi coletado bastante próximo de outro que se enquadra no primeiro grupo (V 13748). Os 13 acessos analisados de *A. magna* se mostraram heterogêneos e talvez não sejam todos conspecíficos, enquanto os 13 de *A. gregoryi*, mesmo com o distanciamento do acesso V14760, se mostraram bastante mais coesos.

No quinto grupo, com *bootstrap* de 40,80, estão os acessos de *A. decora*, *A. palustris* e *A. praecox*, as três espécies da secção *Arachis* que apresentam $2n=2x=18$ cromossomos (Lavia, 1996, 1998; Peñaloza & Valls, 1997). Enquanto os acessos das duas primeiras, originários de Goiás e Tocantins, se mostraram mais próximos, *A. praecox*, do Mato Grosso, situou-se distante, o que poderia ser explicado pela disjunção de mais de 1000 km entre esta e as outras duas espécies. Estudos baseados em marcadores moleculares têm situado as espécies com $x=9$, alternativamente, mais próximo daquelas associadas ao genoma A de *A. hypogaea*, ou a seu genoma B (Creste et al., 2005; Milla et al., 2005).

No sexto grupo, próximos às espécies com 18 cromossomos situam-se os dois acessos de *A. vallsii*. Esta espécie foi originalmente descrita como pertencente

à secção *Procumbentes* (Krapovickas & Gregory, 1994). Porém, sua permanência nessa secção passou a ser contestada a partir de características exomorfológicas, por dados citogenéticos e por cruzamentos eventualmente inviáveis com outras espécies da mesma secção (Lavia, 1999, 2001; Peñaloza, 2003). Uma ampla análise de sua cruzabilidade interespecífica e interseccional mostrou que a espécie forma híbridos com representantes de todos os subgrupos da secção *Arachis*, inclusive com o amendoim e *A. monticola*, embasando, então, a sugestão de sua localização mais adequada na secção *Arachis* (Rodrigues, 2006), mais recentemente reforçada por Lavia et al., (2008). Entretanto, esta espécie, que não possui o par pequeno de cromossomos, não se mostrou próxima ao grupo daquelas mais associadas ao genoma B do amendoim. Ao contrário, ficou em situação mais próxima à das espécies com o par A, que formaram o grupo seguinte.

O sétimo grupo reúne a maioria das espécies analisadas possuidoras do par A, normalmente associadas ao genoma A do amendoim, embora também entre elas haja subgrupos, definidos pelas similaridades e diferenças citológicas em relação aos cromossomos que compõe o genoma A do amendoim, observadas com FISH (Robledo et al., 2009). As relações de distância genética demonstradas no presente trabalho não permitem a visualização das espécies nessas mesmas três categorias. Além disto, *A. duranensis* situou-se, inexplicavelmente, fora deste sexto grupo, ficando no primeiro grupo descrito, o que contrasta fortemente com sua proximidade citogenética com *A. villosa* e *A. schinonii*, reconhecida por Robledo et al., (2009), na constituição do subgrupo de espécies citogeneticamente associadas “da Bacia do Rio da Prata”.

Enquanto *A. stenosperma*, com ampla área de ocorrência e longa disjunção entre o Brasil Central e o litoral Atlântico, com fortes evidências de utilização sob cultivo por populações indígenas em tempos remotos (Custodio, 2005), mostrou boa coesão de seus acessos, *A. kuhlmannii*, de área mais restrita, mostrou-se mais heterogênea. A análise de acessos de *A. kuhlmannii* por meio de descritores morfológicos, citogenéticos e moleculares (RAPD), realizada por Fávero (1999), já havia evidenciado a formação de três agrupamentos bem distintos, indicando que

os materiais atualmente chamados de *A. kuhlmannii* poderiam corresponder a mais que uma espécie. É possível, mesmo, que alguns dos acessos do município de Cáceres – MT identificados como *A. kuhlmannii* sejam, na realidade, representantes de *A. stenosperma*, necessitando de melhor caracterização. Os dados moleculares aqui obtidos corroboram as conclusões de Fávero (1999).

Três outros acessos de *A. kuhlmannii* formaram com *A. kempff-mercadoi*, o oitavo grupo. Observe-se que *A. kuhlmannii* se aproximou tanto de *A. stenosperma*, *A. diogoi* e *A. helodes*, do subgrupo citológico que Robledo et al. (2009) denominam “do Pantanal”, quanto de *A. cardenasii* e *A. kempff-mercadoi*, espécies alocadas a outro subgrupo citológico, o “Chiquitano”.

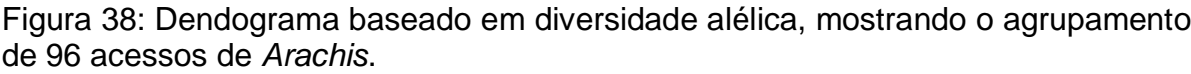
No nono grupo, foram reunidos os acessos da secção *Procumbentes*, *A. lignosa*, *A. matiensis* e *A. pflugeae* e, da secção *Erectoides*, *A. paraguariensis* e *A. stenophylla*. Não houve uma clara separação entre as espécies dessas duas secções. Por fim, *A. kretschmeri*, da secção *Procumbentes*, situou-se à parte, no que seria um nono grupo, com apenas um acesso.

Em vista do principal objetivo deste trabalho ser o conhecimento das relações de afinidade de *A. gregoryi* com outras espécies da secção *Arachis*, ficou evidente a coesão de seus acessos, bem maior que a de um mesmo número de acessos da espécie simpátrica *A. magna*. Também ficou evidente a estreita associação de *A. gregoryi* com *A. ipaënsis* e *A. valida*, e, em menor grau, com *A. magna*, cujos acessos mostraram-se heterogêneos.

Apesar de também serem diplóides com $2n=20$ e sem o par pequeno de cromossomos, *A. williamsii*, *A. batizocoi*, *A. krapovickasii*, *A. glandulifera*, *A. benensis* e *A. vallsii* situaram-se mais distantes do conjunto de acessos de *A. gregoryi*. A localização de *A. cruziana* ficou duvidosa, uma vez que esta espécie, na maioria das análises, tem-se associado estreitamente a *A. batizocoi* e *A. krapovickasii*. Entretanto, sua proximidade com *A. gregoryi* é consequência de ter-se integrado em um subgrupo anômalo do primeiro grupo, que estranhamente compartilha com um acesso isolado de *A. hoehnei* (que aparentemente estaria melhor no quinto grupo) e *A. duranensis* (que estaria melhor situado no sexto grupo).

Arachis ipaënsis mostra plena similaridade citogenética com o genoma B do amendoim (Kochert et al., 1996; Seijo et al., 2004, 2007; Fávero et al., 2006). Porém, só existe um acesso de germoplasma desta espécie, coletado de uma pequena colônia de plantas em um lugar restrito da Bolívia. A proximidade com *A. ipaënsis*, mostrada por *A. gregoryi*, e a disponibilidade de muitos acessos bastante coesos, oriundos de uma ampla área geográfica no Brasil, fronteira à Bolívia, permitindo prever sua ocorrência também naquele país, com mais populações, abre novas possibilidades para a incorporação de genes úteis de espécies mais associadas ao genoma B do amendoim, a partir de um número significativo de acessos.

Além disto, ficou clara a estreita associação de *A. valida*, do Mato Grosso do Sul, a *A. gregoryi* e *A. ipaënsis*, o que ainda enriquece mais o número de acessos com utilidade potencial para inclusão em ações de pré-melhoramento voltadas ao melhoramento de *A. hypogaea*.



6.4- HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA – FISH

A análise de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) envolveu 12 acessos brasileiros de cinco espécies da secção taxonômica típica do gênero *Arachis* (Tabela 10). Os acessos de *A. gregoryi* e *A. magna* foram selecionados conforme sua distribuição geográfica, procurando-se estudar aqueles mais eqüidistantes e, para *A. magna*, alguns intermediários.

Para cada um dos acessos, procurou-se documentar o número de sítios 5S e 45S, o número de sítios sintênicos, o número de cromossomos com bandas centroméricas e identificar outras bandas que eventualmente pudessem aparecer.

Tabela 10: Acessos da secção *Arachis* analisados por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), número de sítios 45S e 5S, número de cromossomos sintênicos (45S/5S), número de cromossomos com bandas DAPI. Para fins de comparação, acrescentam-se dados da literatura referentes às espécies com o nome entre colchetes.

Espécies	Nº sítios 45S	Nº sítios 5S	Cromossomos sintênicos	Nº cromossomos com bandas DAPI
<i>A. glandulifera</i> V 14730	8	2[+2?]	0	16[?]
[<i>A. glandulifera</i>] (Robledo et al., 2008)	10	2	0	16
[<i>A. ipaënsis</i>] (Seijo et al., 2004)	6	2	2	0
<i>A. valida</i> V 9153	6	2	2	0
<i>A. valida</i> V 13514	6	2	2	2
<i>A. magna</i> V 14724	6	2	2	0
<i>A. magna</i> V 13765	4	2	[?]	0
<i>A. magna</i> V 14727	2	2	2	0
<i>A. magna</i> V 13748	2	2	[?]	0
<i>A. magna</i> V 14750	2	[?]	[?]	0
<i>A. gregoryi</i> V 14743	2	2	0	0
<i>A. gregoryi</i> V 14957	2	2	0	0
<i>A. gregoryi</i> V 6389	2	2	0	0
[<i>A. williamsii</i>] (Seijo et al., 2004)	2	2	0	0
[<i>A. batizoco</i>] (Seijo et al., 2004)	6	2	0	18
<i>A. hoehnei</i> V 9146	4	4	4	20

O número cromossômico $2n=2x=20$, que já havia sido contado em *A. gregoryi* V 6389 (Peñaloza & Valls, 2005) e para outros acessos das demais espécies (Fernández & Krapovickas, 1994; Lavia et al., 2008), foi confirmado para os 12 acessos analisados (Figuras 39 e 40).

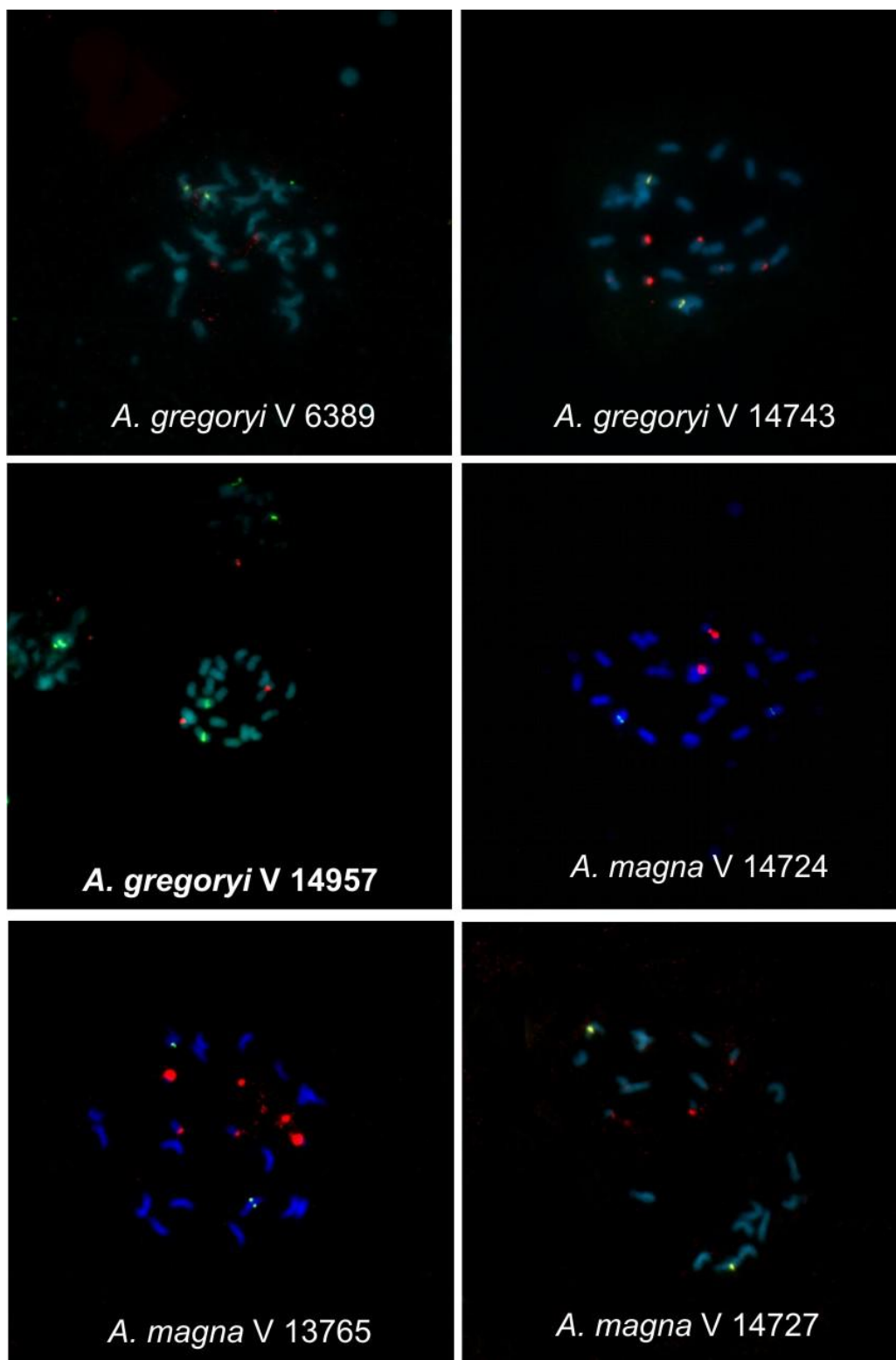


Figura 39: Acessos de *Arachis* analisados por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Em verde sítios 5S; em vermelho sítios 45S.

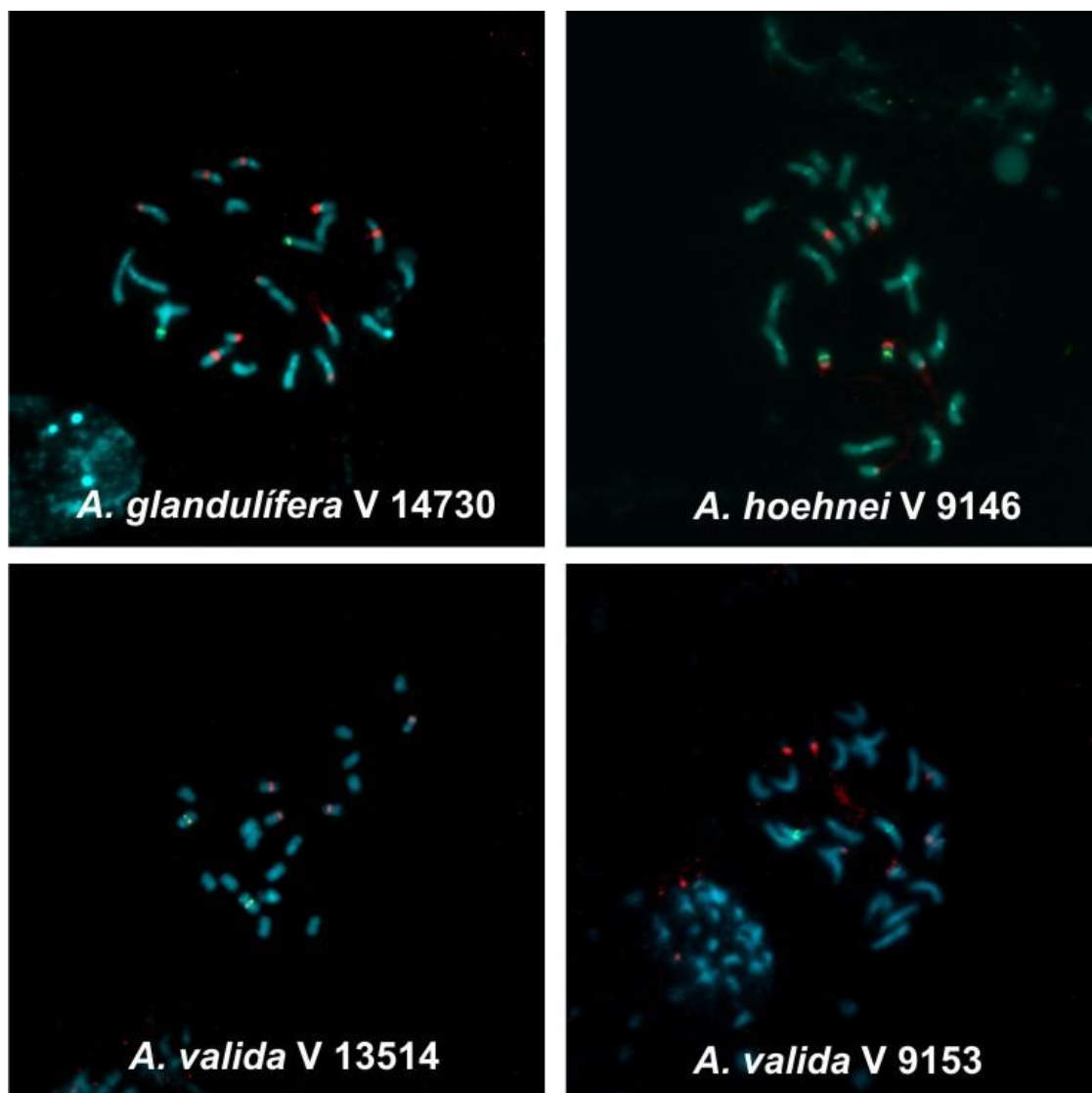


Figura 40: Acessos de *Arachis* analisados por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Em verde, sítios 5S; em vermelho, sítios 45S.

Comparando-se os materiais analisados, em função da ocorrência das bandas 45S, 5S e DAPI, fica evidente a peculiaridade de *A. glandulifera* em relação aos outros 11 acessos. *Arachis glandulifera* V 14730, cuja população de origem é localizada em Vila Bela da Santíssima Trindade, no Mato Grosso, próximo à fronteira Brasil-Bolívia, mostrou oito sítios 45S, tendo um par ativo heteromórfico (ou seja, um dos cromossomos homólogos não apresenta a mesma característica), dois sítios 5S bem visíveis e, possivelmente, mais dois

que não são tão distinguíveis, e sete pares de cromossomos com bandas heterocromáticas DAPI, distribuídas pelo centrômero, satélites e em regiões intersticiais de cromossomos, ou seja, eventualmente com mais de uma banda por cromossomo. Este acesso mostra um padrão de bandas muito semelhante ao reportado por Robledo & Seijo (2008), que analisaram três acessos bolivianos de *A. glandulifera*. Nos acessos analisados por Robledo & Seijo (2008), foram encontrados dois pares de cromossomos sem bandas DAPI e, no acesso brasileiro aqui analisado, há dois ou três pares sem tais bandas.

Como descrito por Robledo & Seijo (2008) *A. glandulifera* apresenta o maior número de sítios 45S já documentado em qualquer espécie diplóide de *Arachis*. A análise do acesso brasileiro de *A. glandulifera* também mostrou o maior número de sítios 45S entre as demais espécies aqui analisadas. Nota-se também a ocorrência de blocos de heterocromatina pericentroméricos e intersticiais nos cromossomos subtelocêntricos.

Arachis glandulifera foi classificada como portadora de um genoma peculiar, denominado genoma D, devido ao seu cariótipo assimétrico que envolve inversões e translocações pericêntricas (Stalker, 1991; Robledo & Seijo, 2008). Porém, análises com marcadores moleculares mostram que existe uma forte relação dessa espécie com algumas daquelas mais associadas ao genoma B de *A. hypogaea* (Moretzsohn et al., 2004; Milla et al., 2005; Tallury et al., 2005). Todavia, cada um dos trabalhos citados indica proximidade com espécies diferentes. Para Robledo & Seijo (2008) a espécie apresenta maior afinidade citogenética com *A. batizocoi*, ainda que existam muitas diferenças entre seus cariótipos. Portanto, o relacionamento de *A. glandulifera* com outras espécies do genoma B ainda não está bem compreendido.

O acesso de *A. hoehnei* mostrou quatro sítios 45S e quatro 5S, em dois pares de cromossomos sintênicos, e bandas DAPI centroméricas em todos os cromossomos. O acesso apresentou um par de cromossomos menor que os demais, mas que não se comporta como o par A, com seu bloco de heterocromatina característico, típico das espécies de genoma A. O padrão de bandas centroméricas o aproxima de *A. batizocoi*, conforme descrito por Seijo et

al. (2004). Com o resultado da pesquisa atual, fica evidente que a classificação de *A. hoehnei* ainda gera dúvidas, ainda podendo haver, entre seus acessos, pelo menos dois tipos de materiais, morfologicamente muito próximos, mas com diferenças citogenéticas significativas, que podem determinar a segregação dos acessos em espécies distintas.

Dois acessos de *A. valida* foram analisados, apresentando bandas muito semelhantes, com seis sítios 45S e dois sítios 5S, havendo sintonia de sítios 45S e 5S em um par de cromossomos. Os acessos não apresentam bandas centroméricas DAPI, embora haja a possibilidade da presença de uma banda heterocromática telomérica no acesso V 13514. Como este acesso mostra dois pares de cromossomos com satélites e o centrômero alongado pode dificultar a interpretação dos elementos visualizados nas preparações mitóticas, este material precisa ser melhor estudado. Todavia, pelas demais características, os acessos de *A. valida* são os que produziram os resultados de FISH mais similares aos de *A. ipaënsis*, que mostra três pares de cromossomos com bandas 45S, um deles sintênico, também com bandas 5S e não tem bandas heterocromáticas centroméricas (Seijo et al., 2004).

Dos cinco acessos analisados de *A. magna*, nenhum mostrou bandas heterocromáticas DAPI e todos apresentaram dois sítios 5S, em um par de cromossomos. A observação de sítios 45S merece aprofundamento, mas foi possível perceber variação entre acessos nesta espécie. Três dos acessos (V 13748, V 14727 e V 14750) mostraram dois sítios 45S, o acesso V 13765 apresentou quatro sítios, enquanto V 14724 mostrou seis sítios 45S, com a mesma sintonia de sítios 45S e 5S documentada em *A. ipaënsis*. É interessante salientar que este último acesso, determinado como *A. magna*, mas que mais se assemelha a *A. ipaënsis* por FISH, é o único sem cerdas nas estípulas, sendo esta uma das características morfológicas diagnósticas para separar *A. ipaënsis* de *A. magna*. Também parece interessante lembrar que *A. batizocoi* mostra o mesmo número de sítios 45S e 5S de *A. ipaënsis*, mas sem cromossomos sintênicos e ainda com bandas heterocromáticas DAPI em 18 de seus 20

cromossomos (Seijo et al., 2004), situação que, a não ser pelo par B-4, afasta seu cariótipo do de *A. hypogaea*.

Os três acessos de *A. gregoryi* mostraram-se uniformes, todos com duas bandas 5S e duas bandas 45S, sem sintenia. Foram encontradas aparentes bandas DAPI centroméricas, de sinais muito fracos, em alguns cromossomos do acesso V 6389. Porém, como esses sinais são bastante débeis, seu aparecimento pode ser um mero artefato, devido a um excesso de digestão com proteinase K. Desta forma, é possível classificar os acessos de *A. gregoryi*, juntamente com as espécies associadas ao genoma B do amendoim, com maior similaridade a *A. williamsii* (Seijo et al., 2004) que com outras espécies já analisadas desse grupo.

7- CONCLUSÕES

Arachis gregoryi mostrou cruzabilidade com várias espécies da secção *Arachis* associadas, em maior ou menor grau ao genoma B de *A. hypogaea*, mas vinculou-se mais estreitamente, por marcadores moleculares e FISH, ao grupo de espécies mais próximas do genoma B, composto por *A. ipaënsis*, *A. magna*, *A. valida* e *A. williamsii*.

Arachis gregoryi apresenta diferenças significativas com sua espécie simpátrica *A. magna* o que permite afirmar que se tratam de espécies diferentes e que devem ser mantidas em classificação taxonômica de espécie distintas.

A análise molecular de representantes de todo o germoplasma disponível de *Arachis gregoryi* deixou evidente a forte coesão de seus acessos, bem maior que a de um mesmo número de acessos da espécie simpátrica e morfologicamente próxima *A. magna*, cujos acessos também se mostraram heterogêneos na análise por FISH.

A similaridade mostrada por *A. gregoryi* com *A. ipaënsis* abre novas possibilidades para a incorporação de genes úteis das espécies silvestres, a partir de um número ampliado de acessos.

Além disto, ficou evidente, pela integração dos dados moleculares, de cruzamentos e citogenéticos, a estreita associação de *A. valida*, *A. gregoryi* e *A. ipaënsis*, o que expande, ainda mais, o número de acessos disponíveis com utilidade potencial para inclusão em ações voltadas ao melhoramento de *A. hypogaea*.

Quanto ao conjunto mais amplo de espécies diplóides da secção *Arachis* sem o par A, *A. gregoryi* formou híbridos com representantes de cada um de seus subgrupos, que gravitam em torno de *A. ipaënsis* (relação mais próxima), *A. batizocoi*, *A. hoehnei*, *A. benensis*, *A. vallsii* e *A. palustris*, mas sua afinidade decresce, a partir de marcadores moleculares, praticamente conforme a mesma sequência, à exceção de *A. benensis*, em que as relações com *A. gregoryi* se

mostraram similares com aquelas evidenciadas com o grupo mais associado a *A. batizocoi*.

A relativa facilidade de formação de híbridos de *A. gregoryi* com espécies associadas ao genoma A de *A. hypogaea* abre novas perspectivas para a produção de anfidiplóides sintéticos para incorporação ao melhoramento do amendoim.

Os resultados obtidos sobre as relações de *A. gregoryi* com *A. hoehnei* reforçam observações deste e de outros trabalhos quanto à provável heterogeneidade dos acessos hoje reunidos sob esta segunda espécie.

8- BIBLIOGRAFIA

- AKKAYA, M.S.; BUYUKUNAL-BAL, E.B. Assessment of genetic variation of bread wheat varieties using microsatellite marker. **Euphytica**, v. 135, p.179-185, 2004.
- BARATA, T.E.; BARBOSA, A.V.G; SANINE, P.R.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Hibridação artificial em espécies relacionadas ao amendoim cultivado: *Arachis stenosperma* (genoma AA) e *Arachis magna* (genoma BB). <http://www.adaltech.com.br/evento/museugoeldi/resumoshtm/resumos/R1041-2.htm> > acesso em 10/05/2005.
- BECHARA, M.D. **Relações filogenéticas no gênero *Arachis*, utilizando espaçadores transcritos internos (ITS) de rDNA nuclear**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2001.
- BENTHAM, G. On the structure and affinities of *Arachis* and *Voandzeia*. **Trans. Linn. Soc** v.18, n.2, p.155-162, London, 1841.
- BENTHAM, G. *Leguminosae* em Martius C., **Flora brasiliensis**, v.15, n.1, p.86-87, 1859.
- BLAIR, M.W.; GIRALDO, M.C.; BUENDIA, H.F.; TOVAR, E.; DUQUE, M.C.; BEEBE, S.E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.113, p.100-1009, 2006.
- BURKART, A. Estudios sobre las Leguminosas-Hedisareas de la Republica Argentina y regions adyacentes. **Darwiniana**, Buenos Aires n.3, p.117-302, 1939.

- BURKART, A. Los frutos de las especies silvestres de *Arachis*. **Proc. Eighth. Amer. Scient. Congress**, n.3, p.175-178, 1942.
- BUROW, M.D.; SIMPSON, C.E.; FARIES, W.; STARR, J.L. and PATERSON, A. H. Molecular biogeography study of recently described B- and A-genome *Arachis* species, also providing new insights into the origins of cultivated peanut. **Genome**, v.52, n.2, p.107-119, 2009.
- CASTRO, C.M.; WAGNER, C.M.; VALLS, J.F.M.; KARIA, C.T. Morphological characters with potential use as varietal descriptors in *Arachis pinto*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p.279-287, 2007
- CHANDRAN, K.; PANDYA, S.M. Relationships among species of *Arachis* based on morphology and germination studies of pollen grains. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.133, p.22-26, 2003.
- CHEVALIER, A. L'origine botanique et l'amélioration des Arachides cultivées. Essai d'une classification systématique. **Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.**, 9 (90): 97-102, 190-197, p.5-8, 1929 (a).
- CHEVALIER, A. Sur une forme ancestrale de L' Arachide cultivée. **Compt. Rend. Herbd. Séances Acad. Sci.**, n.188, p.1511, 1929 (b).
- CHEVALIER, A. Nouveaux documents sur les Arachides. **Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.**, v.9, n.6, p.485-496, 1929 (c).
- CHEVALIER, A. Monographie de L' Arachide. **Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.**, 13 (146-147): p.689-789, 1933.

- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos: terceiro levantamento, dezembro 2008/ Companhia. Nacional de Abastecimento. Brasília: **Conab**, 2008.
- CONAGIN, C.H.T.M. Desenvolvimento da semente do amendoim cultivado *Arachis hypogaea* L.. **Bragantia**, v.16, n.2, 1957.
- CONAGIN, C.H.T.M. Desenvolvimento dos frutos nas espécies selvagens de amendoim (*Arachis* spp.). **Bragantia**, v.18, n.5, 1959.
- CRESTE, S.; TSAI, S.M.; VALLS, J.F.M.; GIMENES, M.A.; LOPES, C.R. Genetic characterization of Brazilian annual *Arachis* species from section *Arachis* and *Heteranthae* using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.52, p.1079-1086, 2005.
- CUNHA, F.B.; NOBILE, P.M.; HOSHINO, A.A.; MORETZSOHN, M.C.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Genetic relationships among *Arachis hypogaea* L. (AABB) and diploid species with AA and BB genomes. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.55, p.15-20, 2008.
- CUSTODIO, A.R. **Biogeografia e variabilidade genética de *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory (Leguminosae), com ênfase em aspectos etnobotânicos, na resistência diferencial às doenças foliares e em sua conservação.** Dissertação de mestrado. UnB, Brasília, 2005.
- DONG, J.; KHARB, P.; CERVERA, M.; HALL, T.C. The use of FISH in chromosomal localization of transgenes in rice. **Methods in Cell Science**, v.23, p.105-113, 2001.
- EINHARDT, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – São Paulo, v.28, n.1, p.5-7, 2006.

FAO The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome, 1996.

FÁVERO, A.P. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de acessos de germoplasma da espécie *Arachis kuhlmannii* Krapov. & Gregory (Secção *Arachis*)**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, 1999.

FÁVERO, A.P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de genes de resistência a doenças do amendoim cultivado**. Tese de doutorado. ESALQ Piracicaba. Janeiro de 2004.

FÁVERO, A.P., SIMPSON, C.E., VALLS, J.F.M., VELLO, N.A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, n.46, p.1546-1522, 2006.

FÁVERO, A.P., MORAES, S.A.; GARCIA, A.A.F.; VALLS, J.F.M., VELLO, N.A. Characterization of rust, early and late spot resistance in wild and cultivated peanut germoplasm. **Scientia Agricola**, v.66, p.110-117, 2009.

FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución em *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.187-220, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220 p., 1996.

- FREITAS, F.O.; MORETZSOHN, M.C.; VALLS, J.F.M. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n.3, p.675-684, 2007.
- GALETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.) **Methods in fruit breeding**, Indiana: Purdue University Press, p.23-47, 1983.
- GALL, J.G.; PARDUE, M.G. Formation and detection of RNA-DNA hybrids molecules in cytological preparation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.63, p.378-383, 1969.
- GERLACH, W.L.; BEDBROOK, J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.7, p.1869-1885, 1979.
- GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; GALGARO, L.M.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. RFLP analysis of genetic variation in species of section *Arachis*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica**, Dordrecht, v.123, n.3, p.421-429, 2002.
(a)
- GIMENES, M.A.; LOPES, C.R.; VALLS, J.F.M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.349-353, 2002. (b)
- GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do amendoim. In: Borém, A. (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, UFV, p.51-94, 1999.
- GREGORY, W.C. Peanuts breeding program underway. **Res. & Farming** 5, Prog. Rep. n.4, p.41-45, 1946.

- GREGORY, W.C; GREGORY, M.P.; KRAPOVICKAS, A.; SMITH, B. W.; YARBROUGH, J. A. Structures and genetic resources of Peanuts. IN: WILSON, C. T. (ed) Peanuts Culture and Uses. **American Peanut Researcher and Education Associates**, Stillwater, OK. Chapter v.3, p.47-134, 1973.
- GREGORY, M.P.; GREGORY, W.C. Exotic germ plasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. **The Journal of Heredity**, v.70, p.185-193, 1979.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetic and Molecular Biology**, v.23, p.1029-1041, 2000.
- GUERRA, M.; LOPES, M. J. S. Como observar cromossomos – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. 1ª Ed. Ribeirão Preto: **FUNPEC**, 131 p., 2002.
- HAMMONS, R.O. The origin and history of the groundnut. In: SMARTT, J. **The groundnut crop. A scientific basis for improvement**, London, Chapman & may, Chapter 2, p.24-42, 1994.
- HERMANN, F.J. A synopsis of the genus *Arachis*. **Agric. Monogr.**, U.S.D.A. n.19, p.26, 1954.
- HOEHNE, F.C. Gênero: *Arachis*. **Flora Brasílica** n.25 (2) part. 122:1-20, tab. 1-15, 1940.
- HOLBROOK, C.C.; STALKER, H.T. Peanut breeding and genetic resources. In: JANICK, J. (ed) **Plant breeding reviews**, John Wiles & Sons Inc., Hoboken, p.297-356, 2003.

- HULL, F.H.; CARVER, W. A. Peanut improvement. Florida Agri. Exp. Sta. **Annual Reporter**, p.39-40, 1938.
- HUSTED, L. Chromosome number in species of peanut, *Arachis*. **American Naturalist**, v.65, p.476-477, 1931.
- HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. I. Chromosome number and morphology. **Cytologia**, n.5, p.109-117, 1933.
- HUSTED, L. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. **Cytologia**, n.7, p.396-423, 1936.
- IBPGR/ICRISAT. **Descriptores para maní**. Rome, IBPGR, p.13-8, 1992.
- JOHANSEN, E.L.; SMITH, B.W. *Arachis hypogaea* X *A. diogeni*, embryo and seed failure. **American Journal of Botany**, v.43, n.4, p.250-258, 1956.
- JOHN, H.A.; BIRNSTIEL, M.L.; JONES, K.W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, n.223, p.582-587, 1969.
- KAWAKAMI, J. Chromosome numbers in Leguminosae. **Bot. Mag.**, n.44, p.319-328. Tokyo, 1930.
- KETRING, D.L. Light effects on development of an indeterminate plant *Arachis hypogaea* cultivar Starr. **Plant Physiology**, n.64, p.665-667, 1979.
- KOCHERT, G.; HALWARD, T; BRANCH, W.D.; SIMPSON, C.E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetic**, v.81, p.565-570, 1991.

- KOCHERT, G.; STALKER, H.T.; GIMENES, M.; GALGARO, L.; LOPES, C.R.; MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.83, p.1282-1291, 1996.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. Cromosomas de una especie silvestre de *Arachis* **IDIA**, v.2, n.24, p.23-24, 1949.
- KRAPOVICKAS, A.; RIGONI, V. A. Estudios citológicos en el género *Arachis* **Revista Investigación Agrícola**, v.5, n.3, p.289-293, 1951.
- KRAPOVICKAS, A.; FERNÁNDEZ, A.; SEELIGMAN, P. Recuperación de la fertilidad en un híbrido interespecífico estéril de *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v.3, n.11, p.129-142, 1974.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.1-186, 1994.
- LAVIA, G.I. Estudios cromosómicos en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v., p.111-120, 1996.
- LAVIA, G.I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $X=9$. **Cytologia**, v.63, p.177-181, 1998.
- LAVIA, G.I. **Caracterización cromosómica del germoplasma del maní**. Tese de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 1999.
- LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; SIMPSON, C.E.; SEIJO, G. Meiotic analysis in wild diploid *Arachis* species. **Cytologia**, n.66, p.293-298, 2001.

- LAVIA, G.I.; ORTIZ, A.M.; FÉRNANDEZ, A. Karyotypic studies in wild germoplasm of *Arachis* (Leguminosae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 2008. (On line first 1573-5109/december)
- LAVIA, G.I.; FÉRNANDEZ, A.; SEIJO, G. Cytogenetic and molecular evidences on the evolutionary relationships among *Arachis* species. In: SHARMA, A.K. AND SHARMA A. **Plant Genome Biodiversity and Evolution** vol.1, part E, p.101-134 Phanerogams – Angiosperm, 2008.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.; GUIMARÃES, P.M.; FÁVERO, A.P.; MORETZSOHN, M. de C.; PROITE, K.; BERTIOLI, D.J. Amendoim selvagem – Uma fonte de resistência a pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.31 – jul/dez, 2003.
- LINNAEUS, C. **Species Plantarum**. v.2, 1753.
- LIU, K.; MUSE, S.V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analyses. **Bioinformatics**, v.21, p.2128-2129, 2005.
- MENDES, A.J.T. Estudos citológicos no gênero *Arachis*. **Bragantia**, v.7, p.257-268, 1947.
- MILLA, S.R.; ISLEIB, T.G.; STALKER, H.T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v.48, n.1, p.1-11, 2005.
- MORAES, S.A.; GODOY, I.J. Diferentes níveis de resistência a *Cercosporidium personatum* em genótipos de *Arachis hypogaea*. **Summa Phytopathologica**, v.11, p.74-86, 1985.

- MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v.4, p.11, 2004 [Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/11>]
- MURRAY M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.
- NIGAN, S.N.; RAO, M.J.V.; GIBBONS, R.W. Artificial hybridization in groundnut. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics – ICRISAT. India. **Information Bulletin**, n.29, 1990.
- NILES, W.L.; QUESENBERRY, K.H. Pollen germination of rhizoma peanut cv. Florigraze. **Peanut Science**, v.19, p.105-107, 1992.
- OLIVEIRA, M.A.P.; VALLS, J.F.M. Produção de híbridos de amendoim forrageiro por meio de hibridação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.6, p.885-888, 2002.
- PEN, S.; ZHUANG, W.J.; HUANG, J.H. Lens and electron microscopic scanning on the pollen morphology of different types and varieties of peanut *Arachis hypogaea* L. **Journal of the Fujian Agriculture College**, n.16, p.313-319, 1987.
- PEÑALOZA, A.P.S.; POZZOBON, M.T.; VALLS, J.F.M. Cytogenetic findings in wild species of *Arachis* (Leguminosae). **Resumos** do 42º Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG, Brasil, 1996.

PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. Contagem do número cromossômico em acessos de *Arachis decora* (Leguminosae). In: I Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais, 1997, Campinas, **Programa e Resumos** ... Campinas: IAC, 1997. p.39.

PEÑALOZA, A.P.S. **Caracterização citogenética de diferentes genomas do gênero *Arachis* L. (Leguminosae).** Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, 2003.

PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.14, n.1-2, p.65-72, 2005.

POMPEU, A.S. Cruzamentos entre *Arachis hypogaea* e as espécies *A. villosa* var. *Correntina*, *A. diogoi* e *A. villosulicarpa*. **Ciência e Cultura**, v.29, n.3, p.319-321, 1977.

POMPEU, A.S. Cruzamentos entre *Arachis hypogaea* e as espécies *A. diogoi* e *A. spp.* (30006, 30005). **Bragantia**, v.42, n.6, p.261-265, 1983.

RAMAN, V.S. Pollen size in natural and synthetic populations of certain plant species. **Journal of Palynology**, n.23, p.320-324, 1965.

ROBLEDO, G.; SEIJO, G. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescent in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.3, p.717-724, 2008.

ROBLEDO, G.; LAVIA, G.I.; SEIJO, G. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and

heterochromatin detection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, n.7, p.1295-1307, 2009.

RODRIGUES, L.S. **Análise das relações de cruzabilidade interespecífica e interseccional no gênero *Arachis***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2006.

ROHLF, F.J. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 2.1. **Exeter Software**, New York, 2000.

SANTOS, R.C.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, V.F. Análise de coeficiente de trilha para os componentes de produção do amendoim. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.13-16, 1999.

SANTOS, V.S.E.; GIMENES, M.A.; VALLS, J.F.M.; LOPES, C.R. Genetic variation within and among species of five sections of the genus *Arachis* L. (Leguminosae) using RAPDs. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v.50, p.841-848, 2003.

SANTOS, R.C.; GODOY, J.I.; FÁVERO, A.P. Melhoramento do amendoim. In: Santos, R.C. Ed. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, cap IV, p.123-192, 2005.

SEIJO, G.J.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.; MOSCONE, E.A. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.91, n.9, p.1294-1303, 2004.

SEIJO, J.G.; LAVIA, G.I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D.A.; BERTIOLI, D.J.; MOSCONE, E.A. Genetic relationships between the

cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**, v. 94, p.1963-1971, 2007.

SICHMANN, W.; FILHO, A.S.; CAVALCANTE, R.D. **Inventário tecnológico do amendoim**, EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 1976.

SILVA, P.A.P.; FÁVERO, A.P. Caracterização reprodutiva e morfológica de híbridos complexos de *Arachis*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52, 2006, **Resumos...**Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. CD-ROM. P.1124

SIMPSON, C.E.; DAVIS, K.S. Meiotic behavior of male-fertile triploid *Arachis* L. hybrids. **Crop Science**, Madison, v.23, n.3, p.581-584, 1983.

SIMPSON, C.E. Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. **Peanut Science**, v.18, p.22-26, 1991.

SIMPSON, C.E.; HIGGINS, D.L.; THOMAS, G.D.; HOWARD, E.R. Catalog of passport data and minimum descriptors of *Arachis hypogaea* L. germplasm collected in South America, 1977-1986. **Bulletin MP-1737**. Texas Agricultural Experiment Station, Texas, 1992.

SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F.M.; MILES, J.W. Reproductive biology and the potential for genetic recombination in *Arachis*. In: Kerridge, P. C.; Hardy, B. (eds) **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Chapter 4. p.43-52. 1994.

- SIMPSON, C.E. Introgression of root-nematode resistance into *Arachis*. In: I Simpósio Latino-Americano de Recursos Genéticos Vegetais. **Resumos**, Campinas: IAC, p.49, 1997.
- SIMPSON, C.E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea*. **Peanut Science**, v.28, n.2, p.114-116, 2001.
- SIMPSON, C.E.; FARIES, M.J. Advances in the characterization of diversity in section *Arachis*: archeological evidence, crossing results and their relationship in understanding the origins of *Arachis hypogaea* L. In: III Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe. **Resumos**, Londrina, p.103, 2001.
- SIMPSON, C.E.; STARR, J.L Registration of “Coan”peanut. **Crop Science**, v.41, p.918, 2001.
- SIMPSON, C.E.; VALLS, J.F.M. Variation in the crossability of *Arachis magna* x *A. Gregoryi*. **Vº Encuentro Internacional de Especialistas en Arachis**. Rio Cuarto, Córdoba – Argentina, 2006
- SMARTT, J.S.; GREGORY, W.C. Interspecific cross-compatibility between the cultivated peanut *Arachis hypogaea* L. and others members of the genus *Arachis*. **Oléagineux** v.22, n.7, p.455-459, 1967.
- SMARTT, J.; GREGORY, W.C.; GREGORY, M.P. The genomes of *Arachis hypogaea* L. Cytogenetic studies of putative genome donors. **Euphytica**, Wageningen, v.27, p.665-675, 1978.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco: **W. H. Freeman**, 1973.

STALKER, H.T.; WYNNE, J.C.; COMPANY, M. Variation in progenies of an *Arachis hypogaea* x diploid wild species hybrid. **Euphytica**, v.28, p.675-684, 1979.

STALKER, H.T. Utilizing wild species for crop improvement. In: STALKER, H.T.; CHAPMAN, C. (Ed.) **Scientific Management of Germoplasm: Characterization, Evaluation and Enhancement**, Rome, International Board for Plant Genetic Resources, (IBPGR Training Courses: Lecture Series, 2), p.139-154, 1989.

STALKER, H.T. A morphological appraisal of wild species of section *Arachis* of peanuts. **Peanut Science**, v.17, p.117-122, 1990.

STALKER, H.T.; DHESI, J.S.; PARRY, D.C.; HAHN, J.H. Cytological and interfertility relationships of *Arachis* section *Arachis*. **American Journal of Botany**, v.78, p.238-246, 1991(a).

STALKER, H.T. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. **American Journal of Botany**, v.78, p.5, p.630-637, 1991(b).

STALKER, H.T.; PHILLIPS, T.D.; MURPHY, J.P.; JONES, T.M. Variation of isozyme patterns among *Arachis* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.746-755, 1994.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. Pollen biology biochemistry management. Heidelberg Berlin, 1974.

STILL, P.E.; PALTA, M.I.; CAMPBELL, R.J.; BUENO, L.C.; CHINCHESTER, E.A. NIBETE, C.L. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* from callus and suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.9, p.37-43, 1987.

- SUBRAMAHNIAN, P.; GRANEKAR, A.M.; NOLT, B.L.; REDDY, D.V.R.; McDONALD, D. Resistance to groundnut diseases in wild *Arachis* ICRISAT – **Proceedings of an International Workshop on Cytogenetics of *Arachis***, Patancheru. p.49-55, 1985.
- TALLURY, S.P.; HILU, K.W.; MILLA, S.R.; FRIEND, S.A.; ALSAGHIR, M.; STALKER, H.T.; QUANDT, D. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1229-1237, 2005.
- TEIXEIRA, C.C.; PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M. Cruzabilidade de espécies da secção *Caulorrhizae* com as das secções *Procumbentes* e *Erectoides* do gênero *Arachis* (Leguminosae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu, **Anais ...** Botucatu: SBZ, 1998. v.2-Forragicultura, p.299-301.
- VALLS, J.F.M.; RAMANATHA RAO, V.; SIMPSON, C.E.; KRAPOVICKAS, A. Current status of collection and conservation of South American groundnut germoplasm with emphasis on wild species of *Arachis*. In: **Citogenetics of *Arachis***. Proceedings of an International Workshop, India, ICRISAT, p.15-35, 1985.
- VALLS, J.F.M. A biodiversidade e o melhoramento de plantas. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2, 2003, Porto Seguro. **Mesas Redondas...** Porto Seguro: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas,. CD-ROM. 6p. [Mesa Redonda 4 – Biodiversidade], 2003.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, n.1-2, p.35-63, 2005.

- VALLS, J.F.M. Taxonomia do gênero *Arachis* à luz das investigações mais recentes. **V Encuentro Internacional de Especialistas en *Arachis***, Rio Cuarto, Córdoba – Argentina, 2006.
- VARMAN, P.V.; GANESAN, K.N.; MOTHILAL, A. Wild germoplasm: potential source for resistance breeding in groundnut. **Journal of Ecobiology**, v.12, n.3, p.223-223, 2000.
- VEIGA, R.F. DE A.; GODOY, I.J.; SAVY FILHO, A.; GERIN, M.A.N., VALLS, J.F.M. Descritores de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) utilizados no Instituto Agronômico. Campinas, Instituto Agronômico, **Boletim Técnico**, 108 21p., 1986.
- WALDRON, R.A. The peanut (*Arachis hypogaea*), its history, histology, physiology and utility. **Contr. Bot. Lab. Univ. Pa.**, n.4; p.301-338, 1919.
- WILLIAMS, D.E. Aboriginal farming system provides clues to peanut evolution. In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J.M. Eds. **Advances in legume systematics: legumes of economic importance**, Kew: Royal Botanic Gardens, p.11-17, 1996.
- WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations vol. 4, variability within and among natural populations. **University of Chicago Press**, Chicago, IL., 1978.

9- ANEXO

Mapas de distribuição geográfica, das coletas realizadas em território brasileiro, das espécies silvestres e de seus acessos usadas durante o desenvolvimento da tese.

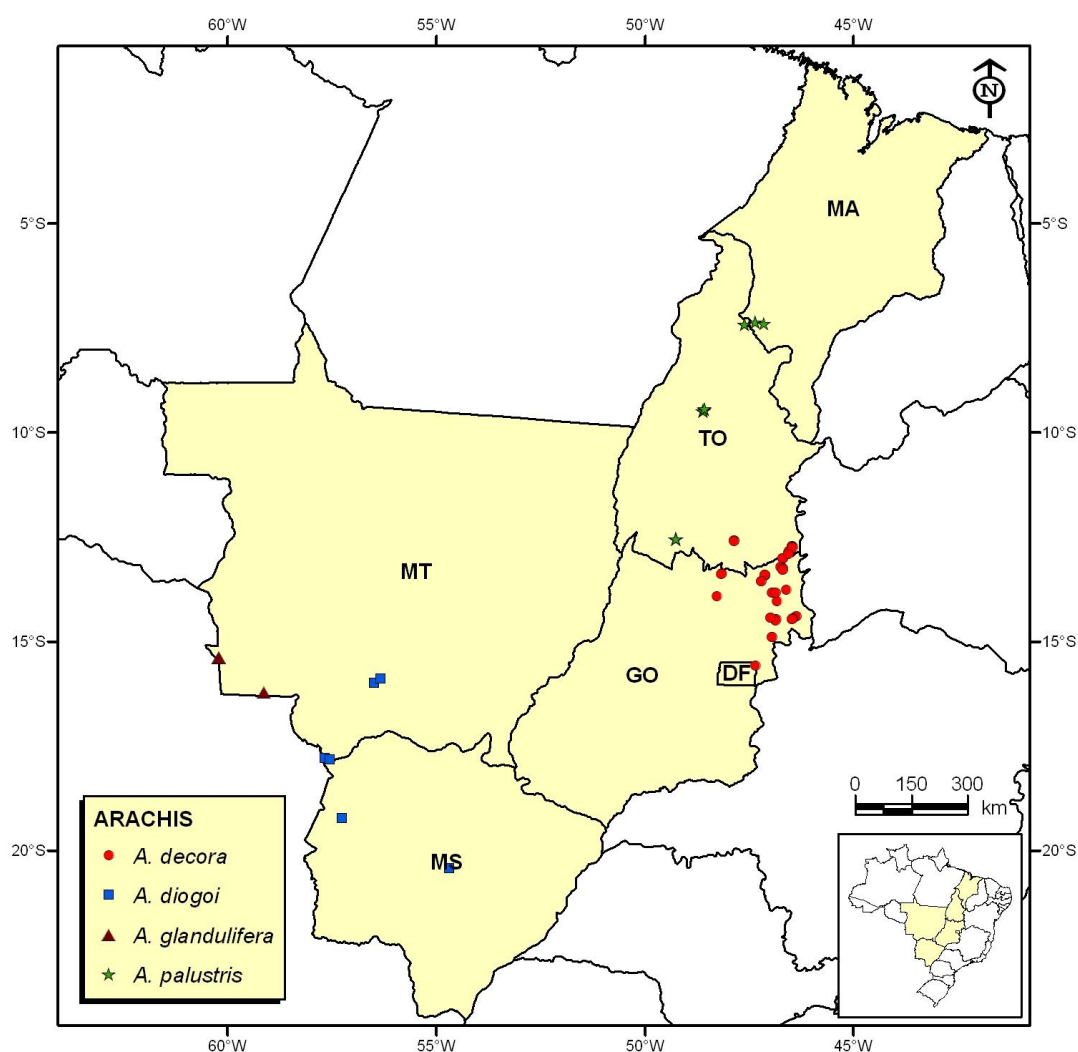


Figura 41 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis decora*, *Arachis diogoi*, *Arachis glandulifera* e *Arachis palustris* no território brasileiro.

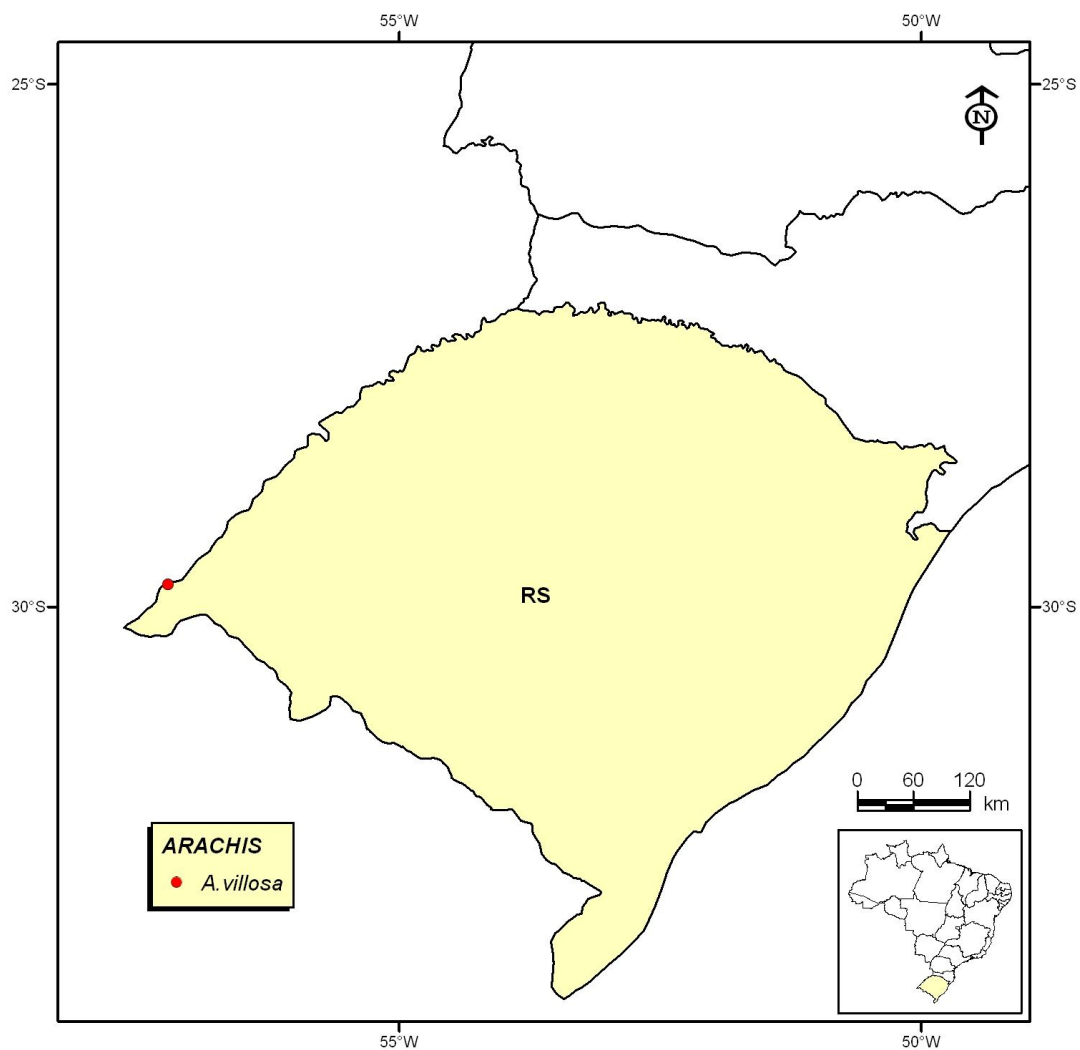


Figura 42 – Mapa de distribuição geográfica das coletas do acesso de *Arachis villosa* no território brasileiro.

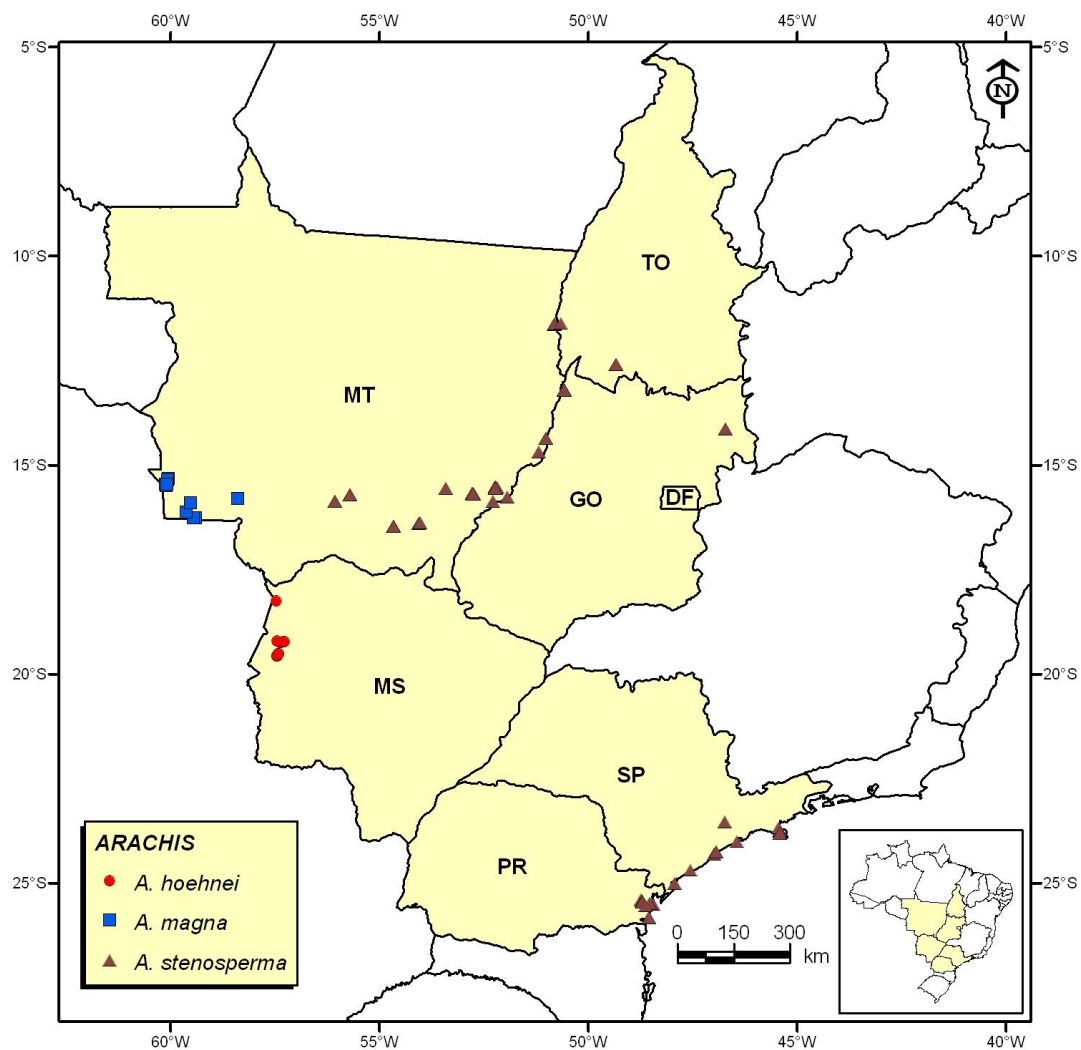


Figura 43 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis hoehnei*, *Arachis magna* e *Arachis stenosperma* no território brasileiro.

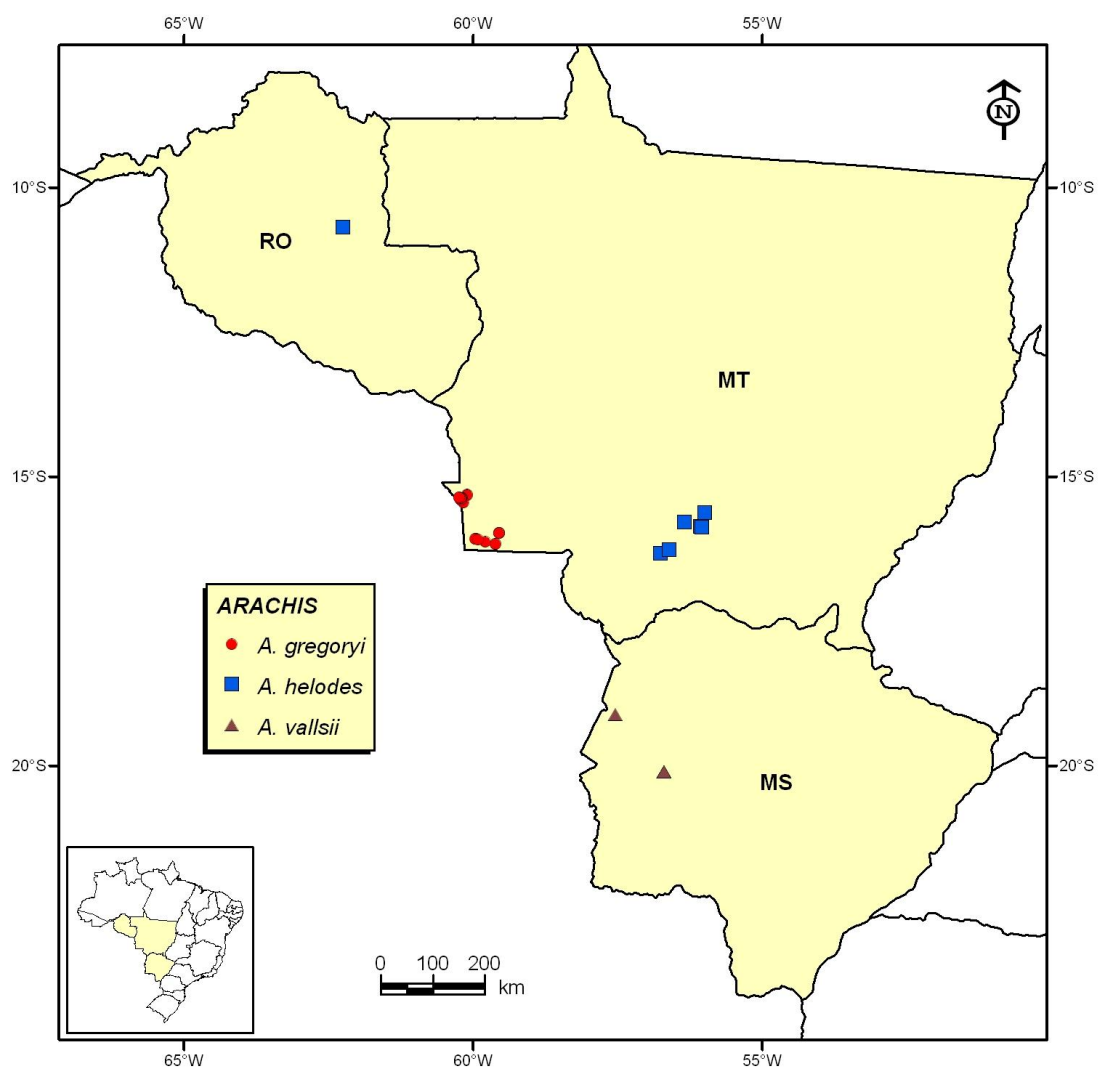


Figura 44 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis gregoryi*, *Arachis helodes*, e *Arachis vallsii* no território brasileiro.

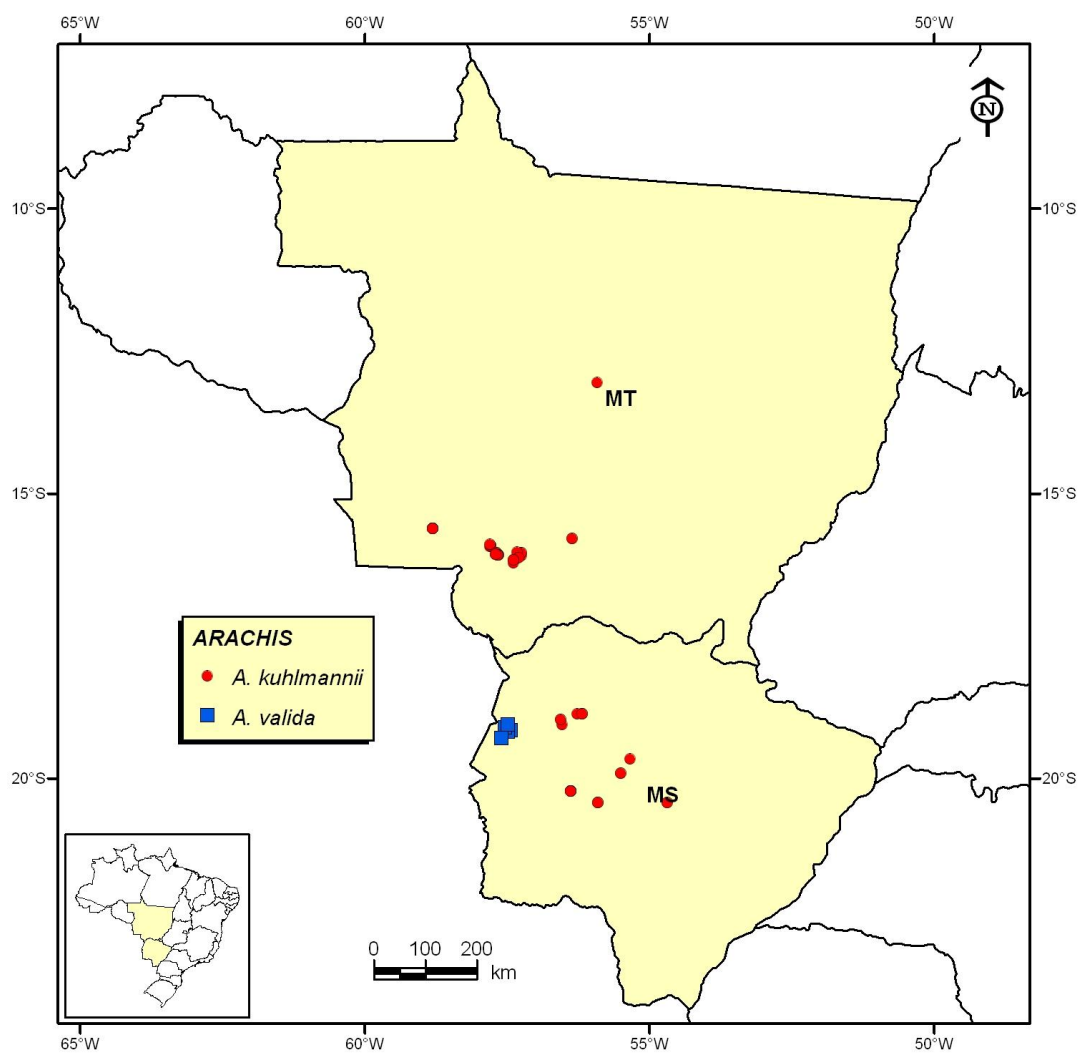


Figura 45 – Mapas de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis kuhlmannii* e *Arachis valida* no território brasileiro.

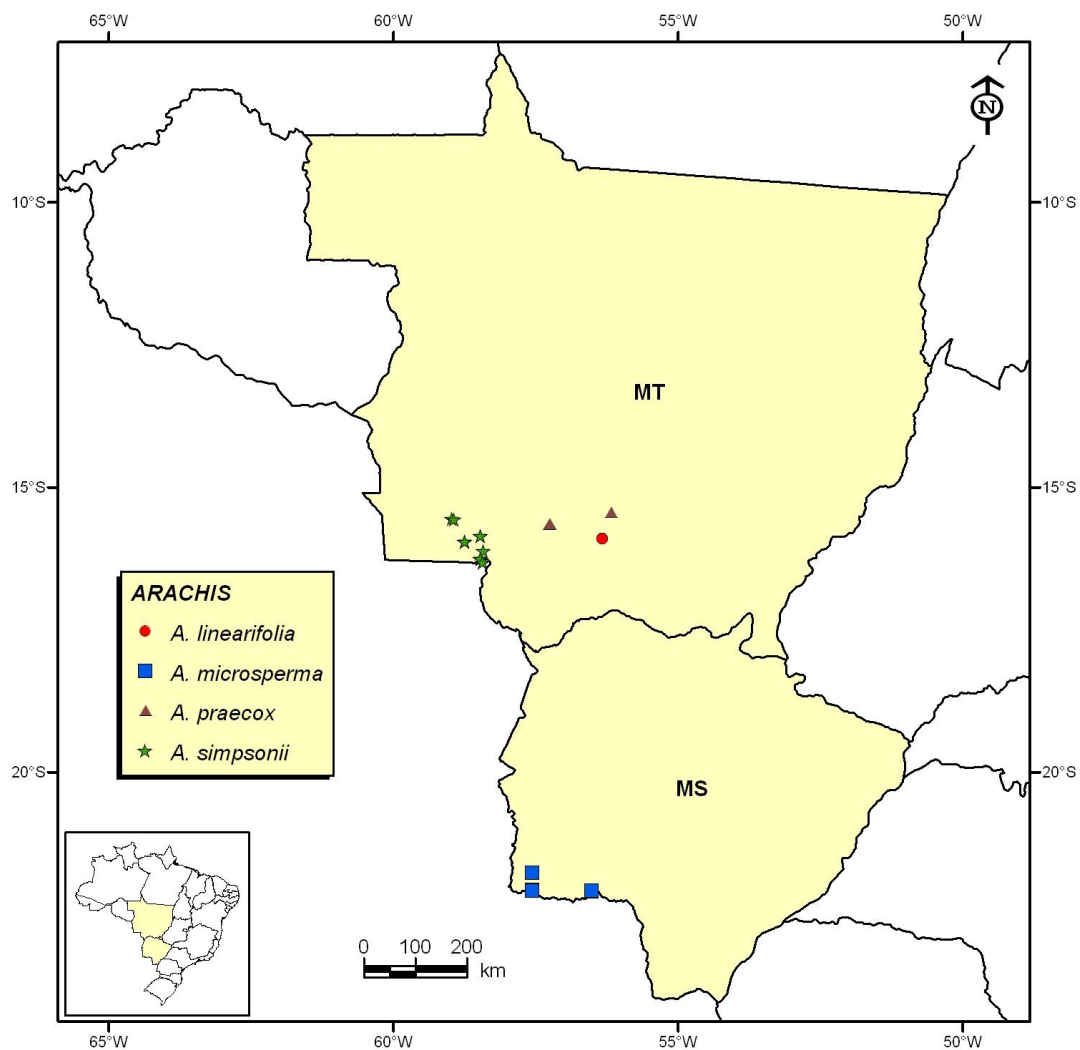


Figura 46 - Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis linearifolia*, *Arachis microsperma*, e *Arachis praecox* e *Arachis simpsonii* no território brasileiro.

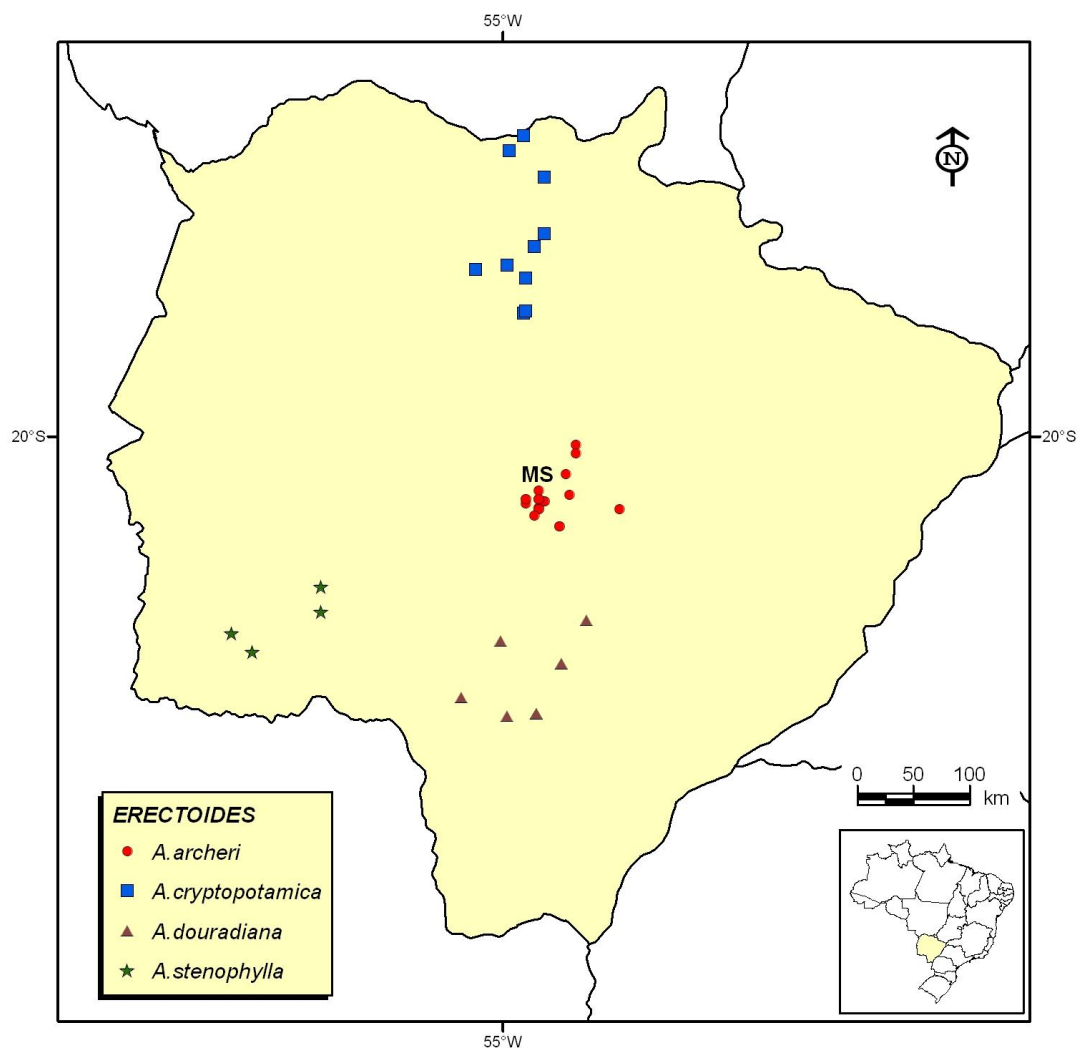


Figura 47 – Mapa de distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis archeri*, *Arachis cryptopotamica*, e *Arachis douradiana* e *Arachis stenophylla* no território brasileiro.

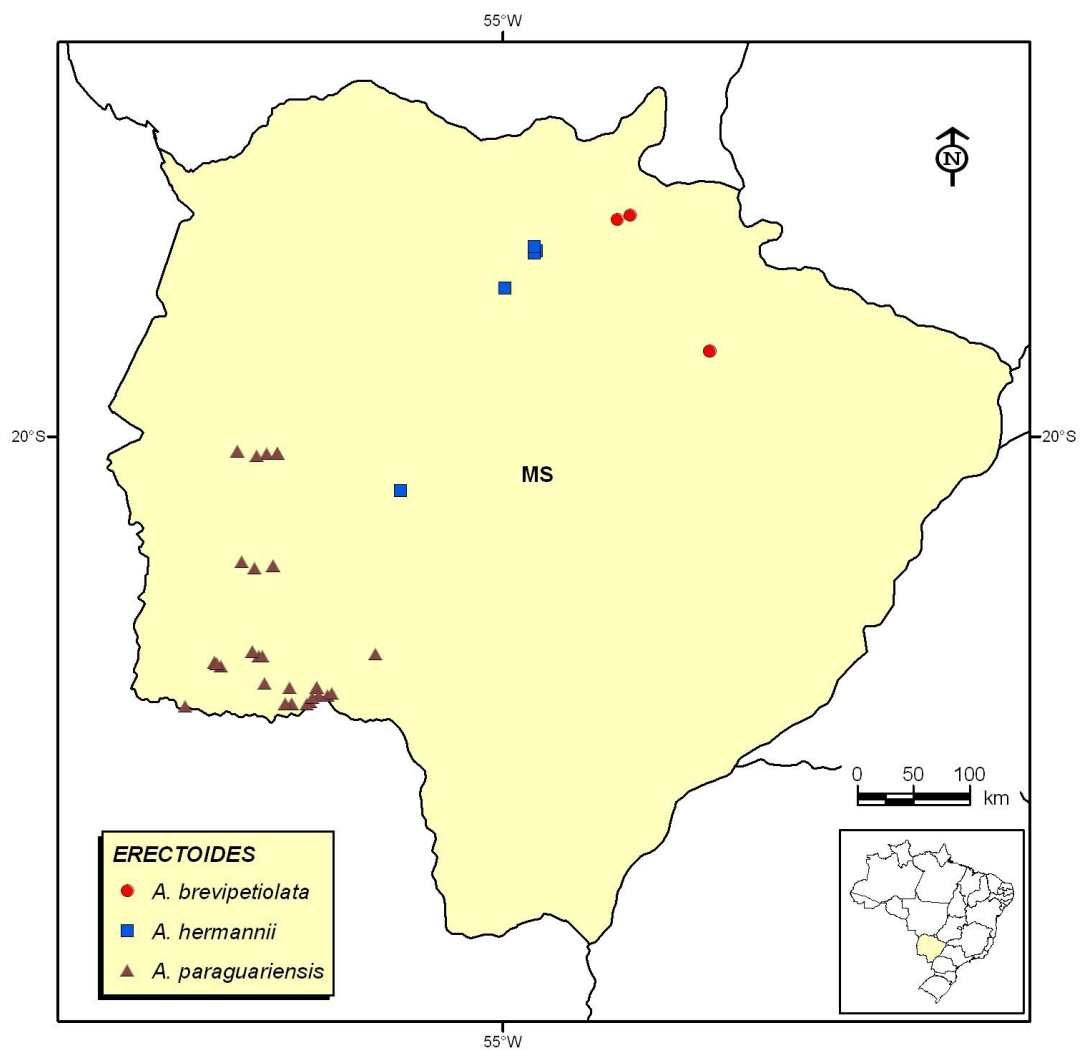


Figura 48 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis brevipetiolata*, *Arachis hermannii*, e *Arachis paraguariensis* no território brasileiro.

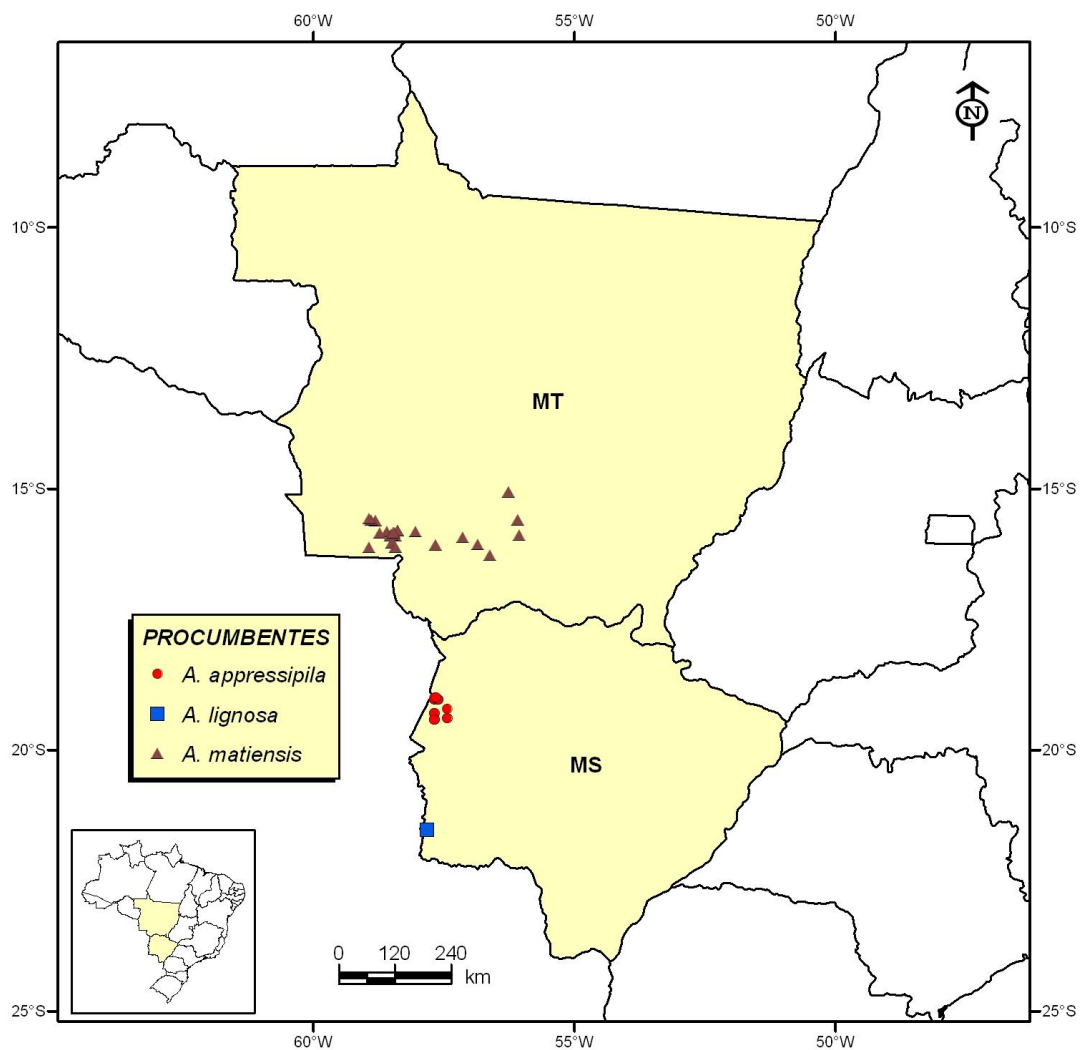


Figura 49 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis appressipila*, *Arachis lignosa*, e *Arachis matiensis* no território brasileiro.

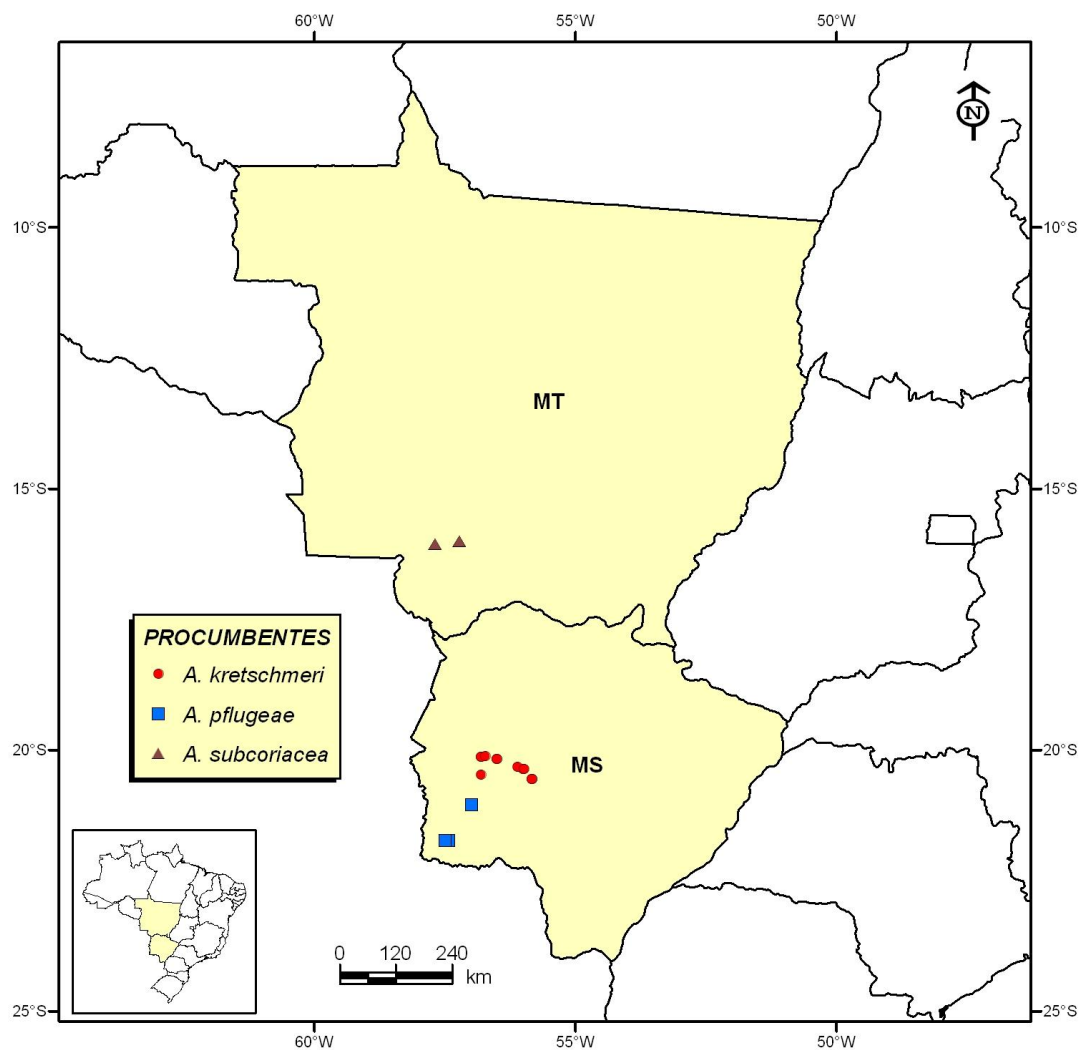


Figura 50 – Mapa distribuição geográfica das coletas dos acessos de *Arachis kretschmeri*, *Arachis pflugeae*, e *Arachis subcoriacea* no território brasileiro.